



EESTI MAAÜLIKOOL
Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Pille Riim

**KARTULIL (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) ESINEVATE
SEENPATOGEENIDE TUVASTAMINE POLÜMERAASI
AHELREAKTSIOONI (PCR) MEETODIL**

DETECTION OF FUNGAL PATHOGENS IN POTATOES
(*SOLANUM TUBEROSUM* L.) WITH POLYMERASE CHAIN
REACTION (PCR)

Magistritöö
Aianduse õppetool

Juhendajad: Liina Soonvald, *MSc*
Riinu Kiiker, *PhD*

Tartu 2021

Eesti Maaülikool		Magistritöö lühikokkuvõte	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51014			
Autor: Pille Riim		Õppetool: Aiandus	
Pealkiri: Kartulil (<i>Solanum tuberosum</i> L.) esinevate seenpatogeenide tuvastamine polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodil			
Lehekülgi: 50	Jooniseid: 18	Tabeleid: 3	Lisasid: 1
Õppetool:		Taimetervis	
Uurimisvaldkond ja CERC S kood:		B390 Taimekasvatus, aiandus, taimekaitsevahendid, taimehaigused	
Juhendajad:		Liina Soonvald, Riinu Kiiker	
Kaitsmiskoht ja -aasta:		Tartu 2021	
<p>Kartulit (<i>Solanum tuberosum</i> L.) ohustavad kogu maailmas mitmed erinevad haigustekitajad, põhjustades mugulatele nii põllul kui hoidlas tõsiseid kahjustusi ja tuues kaasa olulise majandusliku kahju. Efektiivseks taimekaitseks ja haigustekitajate laialdase leviku vältimiseks, tuleks patogeenid kiiresti ja täpselt identifitseerida. Visuaalne haiguste määramine on mitmetel põhjustel ebatäpne, seevastu PCR analüüs võimaldab vähese ajakuluga patogeeni liigini määramist.</p> <p>Antud magistritöö eesmärkideks oli testida valitud liigispetsiifilisi PCR praimereid patogeenide täpseks identifitseerimiseks ning arendada diagnostikat, kasutades gradient-PCR masinat analüüsi optimeerimiseks. Samuti tuvastada PCR metoodikat kasutades, kartulimugula sümptomaatilisel sarnastest sisse vajunud laikudest viie erineva seenpatogeeni olemasolu.</p> <p>Analüüsimiseks vajalikud mugulaproovid koguti 2019. aasta oktoobris Tartumaal asuvatelt väiketootjatelt. Koeproovid eraldati värskelt koristatud mugulatelt ja seejärel peale 3 kuud säilitamist 4°C juures. Analüüsid viidi läbi EMÜ PKI Taimetervis õppetooli fütopatoloogia laboris. Valitud praimerite sobivuse testimiseks ja liigispetsiifiliseks PCR analüüsiks, eraldati mugulate koeproovidest esmalt lüüsilahusega DNA, kontrolliti seente olemasolu ITS praimeritega, optimeeriti kolme praimeripaari seondumistemperatuuri kasutades gradient-PCR'i ning seejärel viidi läbi liigispetsiifilised PCR analüüsid.</p>			

Töö tulemustest selgus, et valitud liigispetsiifilisi praimereid kasutades on võimalik vähese ajakuluga identifitseerida kartulimugulatest erinevad patogeenid ning kasutatud praimerid on piisavalt tundlikud sihtmärkliigi DNA amplifitseerimiseks. Kogutud mugulaproovidest tuvastati *A. alternata* nakkus kokku üheksas proovis, *A. solani* kolmes proovis, *Boeremia* spp. kahes proovis ja *Botrytis cinerea* viies proovis. Perekonna *Fusarium* liike ei tuvastatud.

Kiired, täpsed ja usaldusväärsed tulemused patogeenide määramisel on ülimalt olulised ning antud töö oli samm edasi veelgi paremaks taimehaiguste diagnostikaks kasutades PCR analüüsi.

Märksõnad: kartul, seenpatogeenid, liigispetsiifiline PCR, diagnostika

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Master's Thesis	
Author: Pille Riim		Speciality: Horticulture	
Title: Detection of fungal pathogens in potatoes (<i>Solanum tuberosum</i> L.) with polymerase chain reaction (PCR)			
Pages: 50	Figures: 18	Tables: 3	Appendixes: 1
Chair:		Plant health	
Field of research and (CERC S) code:		B390 Phytotechny, horticulture, crop protection, phytopathology	
Supervisors:		Liina Soonvald, Riinu Kiiker	
Place and date:		Tartu 2021	
<p>Potatoes (<i>Solanum tuberosum</i> L.) are threatened by a number of different pathogens around the world, causing serious damage to tubers both in the field and in storage, and causing significant economic damage. For effective plant protection and to prevent the spread of pathogens, pathogens should be identified quickly and accurately. Visual detection of diseases is inaccurate for a number of reasons, whereas PCR analysis allows detection of a pathogen species in a short time.</p> <p>The objectives of this master's thesis were to test selected species-specific PCR primers for accurate identification of pathogens and to develop diagnostics using a gradient PCR machine to optimize the analysis. Also detect the presence of five different fungal pathogens from symptomatically similar sunken spots in potato tubers using PCR.</p> <p>Tuber samples required for analysis were collected in October 2019 from small producers located in Tartu County. Tissue samples were isolated from freshly harvested tubers and then after storage at 4°C for 3 months. The analyzes were performed in the laboratory of phytopathology of the Chair of Plant Health. For suitability testing of selected primers and species-specific PCR analysis, first the DNA were isolated from tuber tissue samples, then checked for fungal presence with ITS primers, optimized for three primer pair annealing temperatures by gradient PCR, and then species-specific PCR analyzes were performed.</p>			

The results showed that pathogens in potato tubers can be identified in a short period of time using selected species-specific primers, and that the primers used are sensitive enough to amplify the DNA of the target species. Of the tuber samples collected, *A. alternata* infection was detected in a total of nine samples, *A. solani* in three samples, *Boeremia* spp. in two samples and *Botrytis cinerea* in five samples. No species of the genus *Fusarium* were identified.

Fast, accurate and reliable results in the detection of pathogens are very important, and this work was a step forward for even better diagnosis of plant diseases using PCR analysis.

Keywords: potato, fungal pathogens, species-specific PCR, diagnostics

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	8
SISSEJUHATUS	9
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	11
1.1 Kartuli bioloogia.....	11
1.2 Sordiaretus	12
1.2.1 'Teele'	12
1.2.2 'Princess'	13
1.2.3 'Gala'	14
1.2.4 'Wega'	14
1.2.5 'Laura'	14
1.3 Kartulit kahjustavad seenhaigused ning nende sümptomid ja levik.....	15
1.3.1 <i>Alternaria alternata</i> ja <i>Alternaria solani</i>	15
1.3.2 <i>Boeremia</i> spp.	16
1.3.3 <i>Botrytis cinerea</i>	17
1.3.4 <i>Fusarium</i> spp.	18
1.4 Taimehaiguste diagnostika ja PCR.....	19
2. MATERJAL JA METOODIKA.....	21
2.1 Proovide kogumine.....	21
2.2 Molekulaarsed uuringud	21
2.2.1 DNA eraldamine lüüsilahusega	21
2.2.2 ITS praimeritega PCR analüüs	22
2.2.3 Gradient-PCR analüüs	22
2.2.4 Liigispetsiifiline PCR analüüs	23
3. TULEMUSED	25
3.1 ITS praimeritega PCR analüüsi tulemused.....	25
3.2 Gradient-PCR tulemused <i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria solani</i> ja <i>Boeremia</i> spp. praimeritega	26
3.3 Tulemused <i>Alternaria alternata</i> liigispetsiifiliste praimeritega	28
3.4 Tulemused <i>Alternaria solani</i> liigispetsiifiliste praimeritega	29
3.5 Tulemused <i>Boeremia</i> spp. perekonnaspetsiifiliste praimeritega	30

3.6 Tulemused <i>Botrytis cinerea</i> liigispetsiifiliste praimeritega.....	31
3.7 Tulemused <i>Fusarium</i> spp. perekonnaspetsiifiliste praimeritega	32
3.8 Haigustekitajate esinemissagedused mugulaproovides	33
4. ARUTELU	34
KOKKUVÕTE	39
KASUTATUD KIRJANDUS	41
LISAD	48
Lisa 1: Liigispetsiifiliste PCR analüüside tulemuste tabel.	49
Lisa 2: Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendajate kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta	50

KASUTATUD LÜHENDID

bp – aluspaar (*base pair*)

DNA – desoksüribonukleiinhape (*deoxyribonucleic acid*)

ssDNA – üheahelaline DNA (*single-stranded DNA*)

dsDNA – kaheahelaline DNA (*double-stranded DNA*)

PCR – polümeraasi ahelreaktsioon (*polymerase chain reaction*)

ITS – sisemine vahejärjestus (*internal transcribed spacer*)

SISSEJUHATUS

Kartul on tänu suurele saagikusele ja kõrgele toiteväärtusele nisu, riisi ja maisi järel maailmas tähtsuselt neljas toidukultuur (Zaheer, Akhtar 2014) ning sisaldab põhilisi olulisi toitaineid ja mitmeid vitamiine (C-vitamiin, B6-vitamiin) ning mineraalaineid (kaalium, raud, magneesium jne) (Zaheer, Akhtar 2014; Robertson *et al.* 2018). Alates sissetoomisest Eestisse 18. sajandi alguses, kujunes kartul aja jooksul eestlaste jaoks väga oluliseks kultuuriks ning juba 19. sajandi alguses kasvatati kartulit umbes 25% kogu põllumaast (Jõudu 2002; Ereemeev *et al.* 2012).

Aastal 2020 kasvatati Eestis kartulit 3639 hektaril, mis on oluliselt vähem kui aastatel 2018 ja 2019, kui kartulit kasvupind oli vastavalt 5205 ja 5336 hektarit. Kuigi viimasel kolmel aastal on kartuli kasvupind Eestis vähenenud, on keskmine saagikus hektari kohta olnud tõusuteel, mille on põhjustanud põllumajanduse intensiivistamine (PM:0281 2021).

Kogu maailmas mõjutab kartulit umbes 40 mulla kaudu levivat haigustekitajat, põhjustades tõsiseid kahjustusi, eelkõige mugulatele, mis on majanduslikult kõige olulisem osa kartulist (Fiers *et al.* 2012). Taimekasvatustes, sealhulgas ka kartulikasvatustes, on oluline efektiivne ja ennetav taimekaitse. Tähtis on teada kultuuri vastupanuvõimet teda ohustavatele haigustekitajatele ning arvestada seda sordi ja paljundusmaterjali valikul (Martinelli *et al.* 2015). Ebaefektiivselt teostatud taimekaitse võib põhjustada olulist saagikadu ning haigustekitajate laialdase leviku (Ward *et al.* 2004). Kuna erinevad haigustekitajad võivad põhjustada ühesuguseid sümptomeid, on taimekahjustuse esinemisel patogeenide visuaalne identifitseerimine keeruline ning võimalikult täpse tulemuse saamiseks, tuleks võimalusel määramiseks kasutada molekulaarseid meetodikaid (Lõiveke 2002; Xhemali *et al.* 2015).

Antud teemavaldkond on Eesti Maaülikooli lõputöodes vähe kõneainet leidnud ning taimehaiguste määramiseks on töödes kasutatud enamasti mittemolekulaarseid meetodeid. Käesolev töö võib olla aluseks edasisteks taimepatogeenide uurimusteks Eesti Maaülikooli taimetervise õppetoolis, sest proovitakse läbi erinevaid polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) põhinevaid protokolle seenpatogeenide tuvastamiseks ning tuuakse välja erinevate protokollide ja kasutatud praimeripaaride edukus ning sobivus fütopatoloogia laboris.

Antud magistritöö eesmärkideks on testida valitud liigispetsiifilisi PCR praimereid patogeenide täpselt identifitseerimiseks, sealjuures arendada PCR analüüsil põhinevat diagnostikat, kasutades gradient-PCR masinat liigispetsiifilise PCR analüüsi protokollide optimeerimiseks. Teiseks eesmärgiks on tuvastada antud meetodikat kasutades kartulimugula sümptomaatilistest sarnastest sisse vajunud laikudest valitud viie erineva seenpatogeeni olemasolu.

Lähtuvalt käesoleva magistritöö eesmärkidest on töö hüpoteesid järgnevad:

- valitud PCR praimeritega on võimalik täpselt tuvastada uuritavad seenpatogeenid kartuli mugula proovidest;
- kartulimugulate pinnal olevatest sümptomaatilistest sarnastest sisse vajunud laikudest tuvastatakse erinevaid haigustekitajaid (*Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Boeremia* spp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp.).

Töö autor avaldab tänu juhendajatele Liina Soonvaldile ja Riinu Kiikerile, suure toetuse, kasulike näpunäidete ja nõuannete eest töö koostamisel.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Kartuli bioloogia

Kartul (*Solanum tuberosum* L.) on katteseemneliste (*Angiospermae*) hõimkonda, kaheiduleheliste (*Dicotyledonea*) klassi ja maavitsaliste (*Solanaceae*) sugukonda kuuluv mitmeaastane rohtne taim (Mamgain *et al.* 2013). Kultuurtaimena viljeldakse kartulit kui üheaastast taime, sest mugulate idanemine ja uute mugulate moodustumine toimub ühe vegetatsiooniperioodi vältel (Jõudu 2002).

Kartuli taime maapealse osa moodustab vars, mis on arenenud idandi kaelast ning maa-alune osa idandi alusest. Varte harunevuse alusel jaotatakse kartuli sordid hargnevaiks ja mittehargnevaiks (Jõudu 2002; Tartlan 2013). Mittehargnevad sordid on saagikad, kuid vajavad kasvamiseks kõrgemat väetamismnormi. Hargnevate produktiiv-vartega sordid on elujõulisemad ja moodustavad tugeva juurekava, andes suurt saaki ka keskmise viljakusega muldadel (Jõudu 2002). Kartuli narmasjuured paiknevad valdavalt künnikihis, kuid ulatuvad ka kuni 70cm sügavuseni (Joshi *et al.* 2016). Juurestiku levikut mõjutab sordi geneetiline iseärasus, sealjuures varajaste sortide juured on tavaliselt väiksema ulatusega. Juurekava arengut mõjutab mullaniiskus ning sobiva niiskuse korral võib juurdekasv olla kuni 2,5-3cm ööpäevas (Tsahkna 2010; Tartlan 2013).

Kartuliõis on viietine ning moodustub alusel kokku kasvanud viiest kroonlehest. Õie värvus on tähtis sorditunnus ning õied võivad olla valged või antotsüaanide sisaldusest värvunud (Halford 2020). Kartuli õies leiduvad pigmendid erinevad hüdroksüülrühmade arvu poolest (OH-) ning mida rohkem hüdroksüülrühmi, seda sinisem pigment. Levinumad pigmendid õites on pelargonidiin, tsüanidiin ja delfinidiin (Tartlan 2013; Strygina *et al.* 2019).

Kartulimugul moodustub mullas oleva varre külgharu ehk stooloni tipus varuainete kogunemisel (Fisher *et al.* 2008). Stoolonite pikkus määrab moodustuva pesa hajususe või kompaktsuse. Stoolonite pikkus on määratud sordiga, varajastel sortidel on pikemad ja hilistel sortidel lühemad stoolonid (Jõudu 2002). Moodustuvate mugulate suurus ja ühtlikkus

on kõige enam mõjutatud sordist aga ka kasvutingimustest. Sõltuvalt kartuli edasise kasutamise eesmärgist seatakse mugulatele erinevaid nõudeid, näiteks maitseomadused, tärklisesisaldus, kuivainesisaldus, koore värvus, vastupidavus keetmisel jne (Jõudu 2002; Tartlan 2013).

1.2 Sordiaretus

Kartulit paljundatakse vegetatiivselt mugulatega, mugula osadega ja idudega ning generatiivselt seemnetega. Seemnetega paljundamine leiab kasutust sordiaretuses ning tootmises seda üldjuhul ei kasutata (Jõudu 2002). Kartuli sordiaretuse edukus sõltub peamiselt vanemate valikust, mis oleksid saagikad ja väärtuslike tunnustega. Tavapäraselt kartuli sordiaretust tehakse tetraploidsel tasandil (Tsahkna 2002). Eestis tegeleb kartuli sordiaretusega Eesti Taimekasvatuse Instituut.

Oluline roll sordiaretuses on resistentsusaretusel, sest kultuuri saak ja kvaliteet sõltuvad suuresti sordi vastupidavusest taimehaigustele ja -kahjuritele. Haiguskindlus määratakse ära peremeestaime ja haigustekitaja genotüüpide poolt, mida mõjutavad kasvukeskkonna tingimused (Machida-Hirano 2015; Hameed *et al.* 2018). Resistentsusaretust tehakse Eesti Taimekasvatuse Instituudis kartulivähi, -kiduussi, -lehemädaniku, mugulate pruun- ja märgmädaniku, viirushaiguste, varrepõletiku, hariliku ja mustkärna suhtes (ETKI 2021). Oluline aspekt on see, et kui teatud taimehaigusi ja -kahjureid saab tõrjuda taimekaitsevahenditega, siis mõningate kahjustajate puhul puuduvad keemilised tõrjevahendid ja neist saab hoiduda resistentsete sortide kasvatamisega (Tsahkna 2002). Sordiresistentsus on üks efektiivsemaid ja keskkonnasõbralikumaid tõrjemeetmeid, mida saab rakendada nii tava- kui maheviljeluses (Dita Rodriguez *et al.* 2006). Antud töö raames käsitleti viit erinevat kartulisorti, mille sordikirjeldused järgnevad.

1.2.1 'Teele'

Kartulisort 'Teele' on aretatud Eesti Taimekaitse Instituudis, autoriteks Aide Tsahkna, Terje Tähtjärv ja Mati Koppel. Tegu on keskvalmiva ja saagirikka sordiga. Mugulad on ümar-ovaalsed, madalate "silmadega" ning sisu ja koor ühtlaselt kollased (vt joonis 1). Sordil on

head kulinaarsed omadused ja lisaks laua- ja salatikartulile, sobib ka tööstuslikuks koorimiseks. Keetmisel ei tumene ega lagune. Kartulipealsed on hea lehemädanikukindlusega (*Phytophthora infestans*) ning mugulatel hea vastupidavus kartulididussile (*Globodera rostochiensis*), harilikule (*Streptomyces scabies*) ja mustale kärnale (*Rhizoctonia solani*) (ETKI 2013). Terje Tähtjärve (2016) doktoritöös on välja toodud, et sort 'Teele' on mõõdukalt resistentne kartuli-lehemädanikule, nõrgalt resistentne kartulivähi (*Synchytrium endobioticum*) suhtes ning hariliku ja musta kärna suhtes osaliselt resistentne.



Joonis 1. Eesti päritolu kartulisort 'Teele' (Baltic Agro 2021).

1.2.2 'Princess'

Kartulisort 'Princess' on aretatud Saksamaal firmas Solana GmbH & Co. KG (Hamburg, Saksamaa). Tegu on varavalmiva sordiga ning kasvukohana eelistab toitainerikast mulda, kus on ühtlane niiskusrežiim. Mugulad on ovaalsed, „silmad“ madalad, koor ja sisu kollane, mis keetmisel kergelt tumeneb, samas pehmeneb ühtlaselt ja ei lagune (Tartlan 2013). Sordiaretaja andmetel on antud sordil väga kõrge kartuli-lehemädaniku kindlus, kuid Eesti Taimekasvatuse Instituudi andmetel on see sort Eestis leviva *P. infestansi* populatsiooni suhtes vastuvõtlik ja nakatub soodsates oludes lehemädanikku ning näiteks mahetootmisse ei sobi (ETKI 2013; Solana GmbH & Co. KG 2021). Lisaks on sordilehel toodud välja väga kõrge resistentsus hariliku kärna ning kõrge resistentsus mustkärna, hõbekärna (*Helminthosporium solni*) ja varrepõletiku (*Erwinia carotovora ssp. atroseptica*) suhtes (Solana GmbH & Co. KG 2021).

1.2.3 'Gala'

'Gala' on Saksa päritolu kartulisort ja aretatud firmas Norika Kartoffelzucht GmbH (Sanitz, Saksamaa), mis tegeleb seemnekartuli, eeskätt töötlemiseks mõeldud sortide, aretamise ja turustamisega (Norika Kartoffelzucht GmbH 2021). 'Gala' on keskvarajane suuresaagiline intensiivsort. Vajab kasvuks ühtlase niiskussrežiimiga, toitainete rikast ja struktuurset mulda. Mugulad on ovaalsed kuni ümarovaalsed, „silmad“ madalad, koor sile ja sisu kollase kuni tumekollase värvusega. Keetmisel tumeneb minimaalselt ja ei lagune (Tartlan 2013). Belgia sordiaretusfirma Binst Breeding & Selection NV (Grimbergen, Belgia) andmetel on 'Gala' kartulil väga kõrge resistentsus hariliku kärna suhtes ning on resistentne ka kartuli-mustkärnale. Lehemädaniku kahjustus ilmneb pigem lehtedel, mugulad on haiguskindlamad (Binst Breeding & Selection NV 2019).

1.2.4 'Wega'

'Wega' on Saksa firmas Norika Kartoffelzucht GmbH (Sanitz, Saksamaa) aretatud kartulisort (Norika Kartoffelzucht GmbH 2021). Tegu on varajase valmimisega ja suure saagikusega kartulisordiga. Mugulad on piklikud ja ovaalsed, „silmad“ madalad, koor sile ning sisu ühtlaselt kollane. Maitseomadused väga head ning keetmisel ja koorimisel värvimuutust ega tumenemist ei esine. ECPD (*European Cultivated Potato Database*) andmetel on sordil väga kõrge resistentsus lehemädaniku ja mustkärna suhtes ning madal kuni keskmine resistentsus mugulate pruunmädaniku suhtes (ECPD 2014).

1.2.5 'Laura'

Sort 'Laura' on Saksamaal aretatud ja kuulub firmale Europlant Pflanzenzucht GmbH (Lüneburg, Saksamaa). Antud sort on keskvalmiv, kõrge saagikusega ja mugulate suurus pesas on ühtlane. Mugulad on ovaalsed kuni piklik-ovaalsed ja „silmad“ madalad (vt joonis 2). Koor on sile, punast värvi ja sisu ühtlaselt tumekollane ning nii värskelt kui keedetult ei tumene. Säilitusperioodil kvaliteet ei vähene ja püsib kuni järgmise saagini ja kauem. Sordilehe põhjal on antud sordil vähene vastuvõtlikkus harilikule kärnale ning resistentsus

olemas kartulivähile (Europlant Pflanzenzucht GmbH 2021). ECPD (*European Cultivated Potato Database*) andmetel on sordil kõrge resistentsus kartuli-lehemädaniku ja mugulate pruunmädaniku suhtes ning ka kartuli-süvikkärna (*Spongospora subterranea*) suhtes (ECPD 2005).



Joonis 2. Kartulisort 'Laura' (Baltic Agro 2021).

1.3 Kartulit kahjustavad seenhaigused ning nende sümptomid ja levik

1.3.1 *Alternaria alternata* ja *Alternaria solani*

Perekond *Alternaria* on suur ning koosneb mitmest majanduslikult olulisest taimepatogeenidest (Woudenberg *et al.* 2015; Adhikari *et al.* 2017). Saagikaod ulatuvad tavaliselt kuni 50%-ni, kuid kui mugulad on nakatunud ja seega nõrgestatud, suureneb ka sekundaarsete patogeenide arv (van der Waals *et al.* 2001). Haigusele vastuvõtlikel sortidel võib tugeva nakkuse korral saak täielikult hävida, seetõttu on oluline valida kultuuris kasvatamiseks haiguskindlad sordid (Koppel 2020).

Alternaria alternata ja *Alternaria solani* on patogeensed kottseened, millel on palju peremeestaimi ning kartulile põhjustavad kartuli-kuivlaiksust (Lõiveke 2002; Runno-Paurson *et al.* 2015). Kahjustus ilmub õienuppude faasis ning esmalt alumistele lehtedele (Turkensteen 2005). Haiguse kõige iseloomulikumaks tunnuseks on pruunid kontsentriliste ringidega laigud taime maapealsetel osadel (vt joonis 3), aga kahjustus levib ka mugulatele (vt joonis 4) (van der Waals *et al.* 2004; Rooma 2016). Tihedamini haigestuvad õrna koorega sortide mugulad, millele tekivad punakas-pruunid või mustad kollaka äärega laigud, mis on

kergelt sisse vajunud (Lõiveke 1995). Haiguslaigu all on mitte väga sügavale ulatuv pruun ja korgistunud kude (Tamela 2014). Visuaalsel vaatlusel ei ole võimalik kindlaks teha, kas haigusilmingu on põhjustanud *A. alternata* või *A. solani* (Rotem 1994; Van der Waals *et al.* 2004).



Joonis 3. Kartuli-kuivlaiksuse kahjustus kartulipealsetel (Koppel 2020).



Joonis 4. Kartuli-kuivlaiksuse kahjustus kartuli mugulal (Koppel 2020).

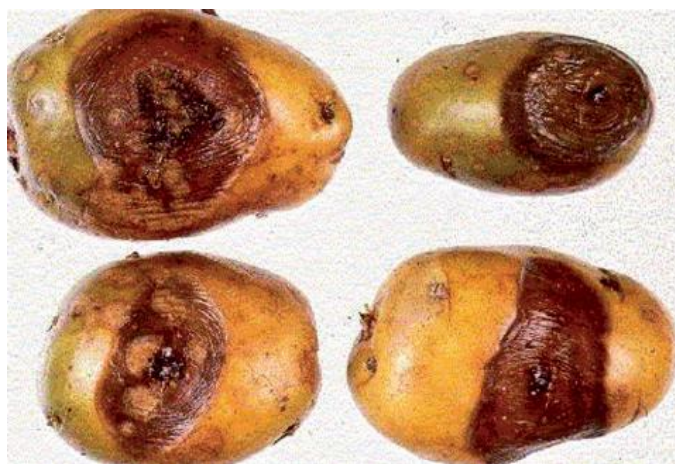
Haigustekitajad levivad mugulate, mulla ja taimejäänuste kaudu ning püsivad mullas elujõulisena 2-3 aastat. Haiguse intensiivseks levikuks on kõige optimaalsemad tingimused kõrge õhuniiskus ning õhutemperatuur 25-28°C juures (Tsahkna 2002; Rooma 2016). Nakkuse vältimiseks valida haiguskindel sort ning peale koristust hävitada korralikult taimejäänused (Koppel 2020).

1.3.2 *Boeremia* spp.

Boeremia (sün. *Phoma*) on laialdaselt levinud kottseente perekond, kus on kirjeldatud ligikaudu 3000 taksonit, sealhulgas umbes sada liiki on patogeensed ja kahjustavad levinud kultuurtaimi, peamiselt maavitsalisi (Deb *et al.* 2020). *Phoma* on taksonoomiliselt vastuoluline perekond, sest olenemata kogutud morfoloogiliste ja molekulaarsetele andmetele, puuduvad endiselt liikide vahelised selged piirid. Aja jooksul on *Phoma* perekonnast osaliselt eraldatud perekond *Boeremia*, kuid siiski kasutatakse liikide nimetamisel antud perekondi veel sünonüümidenä (Bennett *et al.* 2018).

Boeremia exigua var. *exigua* (sün. *Phoma exigua* var. *exigua*) ja *B. exigua* var. *foveata* (sün. *Phoma exigua* var. *foveata*) on mulla kaudu levivad saprotroofse eluviisiga patogeensed kottseened. Antud patogeendid kahjustavad kartulit sageli samaaegselt, ehkki *B. exigua* var.

foveata-t tuntakse eeskätt kui kartuli-fomoosi ehk gangreeni tekitajana ja *B. exigua* var. *exigua*-t pigem laikpõletiku (*leaf spot*) tekitajana (CABI 2019; Deb *et al.* 2020; Koppel 2020; CABI 2020). Tegu on majanduslikult oluliste patogeenidega, kahjustavad nii pealseid kui mugulaid, seostatakse neid eriti koristusjärgsete haigustega (mädanikud) ning saagikaod säilitamisel võivad olla kuni 20% (Tartlan 2013; Koppel 2020; Colman *et al.* 2020).



Joonis 5. *Boeremia exigua* var. *exigua* ja *Boeremia exigua* var. *foveata* kahjustus kartulimugulatel (Koppel 2020).

Esmalt tekivad vartele piklikud pruunikad laigud, mille peale moodustuvad mustad seenestruktuurid pükniidid (vt joonis 5). Haiguse arenedes nakkuslaigud lõhenevad ning varred võivad murduda (Lõiveke 1995; Koppel 2020). Mugulatele ilmnevad haigustunnused tavaliselt hoidlas detsembris või jaanuaris, kui mugula pinnale tekivad 1-2mm suurusel kergelt sisse vajunud hallid kuni punakaspruunid laigud, mis tekivad enamasti mugula silmade ja vigastuste kohale. Kevadeks laigud suurenevad 5-25mm-ni ning muutuvad mustjas-pruuniks, eristudes nähtavalt tervest taimekoest. Nakatunud mugulad sageli mädanevad, sarnanedes kartuli-kuivmädanikuga (Tartlan 2013). Mugulanakkus toimub enamasti koorevigastuste kaudu, kandudes edasi nii nakatunud mugulate kui ka mulla kaudu ning mitte ainult põllul vaid ka hoidlas. Leviku vältimiseks tuleks nakatunud mugulatega kokku puutunud hoidla ja kasutatavad konteinerid põhjalikult desinfitseerida (Koppel 2020).

1.3.3 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea on õhu kaudu leviv nekrotroofse eluviisiga patogeenne kottseen, mis kahjustab üle maailma rohkem kui 200 erinevat taimeliiki nende hulgas ka mitmeid olulisi

põllukultuure, näiteks maasikas ja kartul, põhjustades neil hahkhallitust (Steere, Kirk 2015; Petrasch *et al.* 2019). Olenemata laialdasest levikust on antud patogeeni poolparasiit, mis tungib tavaliselt nõrgematesse ja vigastatud taimedesse (Buczacki, Harris 2010). Antud patogeeni ei kahjusta kartuli taimi ja mugulaid mitte ainult põllul vaid ka saagikoristusjärgsel transpordil ja ladustamisel (Espino *et al.* 2010). Kahjustus ilmub esmalt kartuli lehtede tippudesse ja leheservadesse, sealne lehekude kolletub ja pruunistub ning kahjustunud koe peale tekivad hallikad koniidid ehk eosed, mis aja jooksul kuhjuvad ning moodustavad koheva mütseeli (Leit 2014; Steere, Kirk 2015). Kahjustus areneb mööda leherootsusi varre suunas kiiresti edasi, põhjustades taime enneaegset närbumist (Williamson *et al.* 2007). Haigustunnused sarnanevad mitmete teiste patogeenide põhjustatud sümptomitega, mistõttu aetakse *B. cinerea* kahjustus tihti segi *A. alternata* ja *A. solani* tekitatud kartuli kuivlaiksusega või kartuli lehemädanikuga (*P. infestans*) (Steere, Kirk 2015; Koppel 2020).

Haigustekitaja levik on kõige intensiivsem põuastel aastatel ning nakatumist soodustavad kastused ja jahedad ööd (Koppel 2020). Kartul võib nakkuse saada ka seemnematerjalist, kus haigustekitaja hakkab arenema emamugulal olnud mütseelist (Steere, Kirk 2015). Laialdase leviku vältimiseks tuleks kasutada integreeritud taimekaitse põhimõtteid ning patogeeni ilmumist ennetada õigete mullaharimisvõtetega, viljavaheldusega ja tasakaaluka väetamisega, sest toitainete puudus ja stress nõrgestavad taimi ning haigustekitaja võib seeläbi kiiremini levima hakata (Steere, Kirk 2015; Koppel 2020).

1.3.4 *Fusarium* spp.

Perekonnal *Fusarium* on üle 200 erineva peremeestaime, tekitades fusarioosi, närbumistõbe, juuremädanikku, tõusmepõletikku jne (Lõiveke 2002; Walder *et al.* 2017). Tegu on majanduslikult väga olulise patogeeni perekonnaga ning laialdane levik võib kaasa tuua olulist majanduslikku kahju (Koppel 2020). Kartulil põhjustab antud patogeeni kartuli-kuivmädanikku, mis on kõige levinum kartuli säilitushaigus (Rooma 2016).

Haigustunnused avalduvad hoidlas, tavaliselt mõni nädal peale koristamist, mõnedel andmetel ka kuni 2 kuud pärast säilitamise algust (Agrios 2005; Rooma 2016). Haigus siseneb mugulatesse peamiselt koristamise käigus tekkinud mehaaniliste vigastuste kaudu

(Stevenson *et al.* 2001). Haigustekitaja levib peamiselt seemnekartuli ja mulla kaudu (Koppel 2020). Nakatunud mugula esimeseks sümptomiks on tumedad või hallikad laigud mugula pinnal (vt joonis 6, joonis 7). Haiguse arenedes muutuvad laigud kortsuliseks ning haiguslaigu all olevad koed kuivavad ning tumenevad (Bojanowski *et al.* 2013; Tein 2015). Haigustekitaja areneb mugula pinnalt kiiresti mugula sisemusse ning mugula täielikul mädanemisel see mumifitseerub (Agrios 2005; Rooma 2016).



Joonis 6. *Fusarium* spp. kahjustus kartulimugulatel (Koppel 2020).



Joonis 7. *Fusarium* spp. kahjustus kartulimugulatel (Koppel 2020).

Kartuli kuivmädaniku põhjustatud saagikaod võivad hinnanguliselt olla 6-25% koristatud saagist ning enam kui 60% võib nakatuda peale koristamist säilitusperioodil (Tein 2015). Kuna kuivmädanikule resistentseid sorte saadaval veel ei ole (D'Ippólito *et al.* 2010), tuleb haigustekitaja ilmingut vältida ennetavate meetoditega, näiteks läbimõeldud külvikorra rakendamine, puhitud seemne kasutamine (Koppel 2020), umbrohutõrje ja vältida nii koristusel kui ka sorteerimisel ja hoiustamisel mehaanilisi vigastusi (Tein 2015; Rooma 2016). Mugulaid tuleks säilitada temperatuuril 2-4°C ning hoiuruumi mitte liigselt ventileerida. Oluline on ka hoidlate ja konteinerite regulaarne desinfitseerimine ja puhastamine (Koppel 2020).

1.4 Taimehaiguste diagnostika ja PCR

Taimehaiguseid põhjustavate patogeenide võimalikult kiire ja täpne identifitseerimine on vajalik nii haigustekitajate bioloogia ja leviku uurimiseks, kui ka põhjustatud haiguste diagnostikaks ning vajalike tõrjemeetmete rakendamiseks (McCartney *et al.* 2003; Riim 2019). Taimehaigused võivad põhjustada olenevalt ulatusest väga suuri saagi kadusid ning

Adhikari *et al.* 2017 on toonud välja, et hinnangulised saagikaod võivad olla isegi ligi 80%. Tulemusliku taimekaitse esimene ja oluline samm on haigustekitaja täpne määramine (Buczacki, Harris 2010). Taimehaiguseid määratakse enamasti visuaalselt, tuginedes haigussümptomitele ja haigustunnustele. Sümptomite põhjal määramisel ei saa tulemuses alati lõpuni kindel olla, sest sarnaseid sümptomeid võivad põhjustada nii patogeendid kui füsioloogilised tingimused taimes (Riim 2019). Seetõttu täpsemaks määramiseks võetakse taimedelt proovid ning analüüsitakse proove laboris, pannes need selektiivsetele või diferentseeritud söötmetele kasvama (Sousa, Pereira 2013; Riim 2019). Mikroorganismide söötmel kasvatamine võib kesta mõnest päevast kuni mõne nädalani, mistõttu sel viisil patogeenide määramine on väga ajamahukas (Ward *et al.* 2004). Lisaks nõuab haigustekitajate täpne identifitseerimine palju teadmisi taksonoomiast ja mikrobioloogiast (Michailides *et al.* 2005; Riim 2019).

PCR ehk polümeraasi ahelreaktsiooni (*polymerase chain reaction*) analüüs pakub olulisi eeliseid mittemolekulaarsete diagnostikameetoditega võrreldes, näiteks mikroorganisme ei pea söötmel kasvatama, teiseks on potentsiaal tabada ühte kindlat sihtmolekuli komplekssegu ning kolmandaks vähene ajakulu (Schena *et al.* 2013; Riim 2019). Liigispetsiifiline PCR mitte ainult ei tuvasta DNA-d, vaid võimaldab liigi või kõrgema taksoni määramist (Riim 2019). PCR analüüsi käigus toimub DNA-matriitsi, DNA polümeraasi, praimerite ja nukleotiidide kuumutamise ja seejärel jahutamise tsükliline protsess, mille lõpptulemusena on võimalik tuvastada taime kahjustanud patogeen (Riim 2019). PCR analüüs annab küll täpse ja kiire tulemuse, kuid samuti nõuab läbiviimiseks eriaparatuuri ja spetsialiste.

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1 Proovide kogumine

Antud töö tarbeks koguti vajalikud proovid Tartumaal asuvate väiketootjatelt, kes tegelevad tavaviljelusega kartulite kasvatamisega. Proovide kogumine toimus juhuslikkuse alusel ilma sordieelistusteta, kuid analüüsimiseks vajalikud proovid võeti eeskätt sümptomaatilistest laikudest kartuli mugula pinnal (vt joonis 8, joonis 9). Esmalt pesti mugulad veega ning siis võeti igast sordist viis sümptomaatilist kartuli mugulat ning eraldati prooviks vajalikud tükid (ca 0,5g). Lisaks võeti igast sordist veel viis sümptomaatilist kartuli mugulat, mida säilitati hoidlas 4°C juures 3 kuud, seejärel eraldati ka nendest kartulimugulatest analüüsimiseks vajalikud tükid. Esimene proovivõtt toimus 16. oktoober 2019 ja teine proovivõtt 16. jaanuaril 2020. Laboratoorsed analüüsid teostati Eesti Maaülikooli fütopatoloogia laboris.



Joonis 8. Kartulimugul 'Gala' (Kiiker 2020).



Joonis 9. Kartulimugul 'Laura' (Kiiker 2020).

2.2 Molekulaarsed uuringud

2.2.1 DNA eraldamine lüüsilahusega

Kartulimugula proovidest eraldati esmalt lüüsilahusega DNA kasutades Loit *et al.* (2019) protokoll. Analüüsiks kasutati 100µl lüüsilahust (Solis Biodyne Buffer B, Tartu, Eesti) ja 2,5µl laia toimespektriga proteaasi *Proteinase K* (Thermo Scientific, Waltham, MA,

Ameerika Ühendriigid). Seejärel lisati mugula koetükk lüüsilahusesse ja inkubeeriti üleöö 56°C juures. Edasi kuumutati proovi 15 minutit 98°C juures, et inaktiveerida *Proteinase K*. Seejärel tsentrifuugiti proovid 2 minutit 11000rpm juures. Peale tsentrifuugimist pipeteeriti sadet vältides vedelik uude steriilsesse Eppendorf tuubi ning saadud lahusest tehti 10x lahjendused, mida kasutati edasi PCR-reaktsioonides.

2.2.2 ITS praimeritega PCR analüüs

Seente universaalpraimereid (ITS) kasutades viidi läbi PCR-reaktsioon, mille tarbeks kasutati 1µl eelnevalt eraldatud ja lahjendatud DNA lahust, millele juurde lisati 5µl Hot FIREPol Blend Master Mix'i, 18 µl destilleeritud vett, 0,5µl pärissuunalist praimerit ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes, Bruns 1993) ja 0,5µl vastassuunalist praimerit ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.* 1990). PCR analüüs viidi läbi Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Saksamaa) masinaga. PCR reaktsioonitsükkel oli järgmine: DNA ahelate esmane denaturatsioon (15 minutit, 95°C), seejärel 40 korduvat tsükli, mis koosnesid ahelate denaturatsioonist (30 sekundit, 95°C), praimerite seondumisest (30 sekundit, 55°C) ning DNA sünteesist (60 sekundit, 72°C). Programmi lõpetas DNA sünteesi lisaetapp (10 minutit, 72°C), kus DNA polümeraas sünteesib lõpuni üheaahelalised DNA lõigud.

PCR reaktsiooni produkti kontrolliti geelelektroforeesil, milleks valmistati 1,5% agarosgeel 0,5x TBE puhvis, värvainena kasutati 5% etiidiumbromiidi lahust. Peale geeli tardumist kallati geel elektrootodidega piiratud puhvrivanni, kuhu pipeteeriti 5µl PCR produkti. Amplifitseeritud DNA lõigu olemasolu geelis visualiseeriti Uvidoc (Cambridge, Suurbritannia) geelipildistamise masinal.

2.2.3 Gradient-PCR analüüs

Kui ITS praimereid kasutades oli seente olemasolu eraldatud DNA-s kindlaks tehtud, testiti valitud liigispetsiifilisi praimereid gradient-PCR masinal. Neid praimereid, mida on varasemalt EMÜ fütopatoloogia laboris taimahaiguste diagnostikas kasutatud ja tulemuste

põhjal temperatuure optimeeritud, gradient-PCR-i läbi ei viidud. Gradient-PCR analüüsid tehti *Boeremia spp* (Carbone, Kohn 1999), *A. solani* ja *A. alternata* praimeritele (Volz 2014; Leiminger *et al.* 2013).

Gradient-PCR programm *A. solani* ja *Boeremia spp* puhul: esmane denaturatsioon (10 minutit, 95°C), seejärel 40 korduvat tsüklit, mis koosnesid ahelate denaturatsioonist (10 sekundit, 95°C), praimerite seondumine 12-nel erineval temperatuuril (55°C, 55,91°C, 56,82°C, 57,73°C, 58,64°C, 59,55°C, 60,45°C, 61,36°C, 62,27°C, 63,18°C, 64,09°C, 65°C) 20 sekundit ja ekstensioonist (72°C, 20 sekundit). *A. alternata* puhul oli gradient-PCR programm sama, kuid praimerite seondumine toimus 11-nel erineval temperatuuril (53,00°C, 53,91°C, 54,82°C, 55,73°C, 56,64°C, 57,55°C, 58,45°C, 59,36°C, 60,27°C, 61,18°C, 62,09°C). PCR produktid kontrolliti geelelektroforeesil vastavalt peatükis 2.2.2 toodule.

2.2.4 Liigispetsiifiline PCR analüüs

Liigispetsiifiliseks PCR analüüsiks kasutati eelnevalt eraldatud ja lahjendatud DNA lahust, millele juurde lisati Hot FIREPol Blend Master Mix'i, destilleeritud vett ja vastavad päri- ja vastassuunalised praimereid. PCR täpsed programmid ja reaktsioonisegud on välja toodud tabelis 1. Kõik reaktsioonid viidi läbi 40 tsükliga, välja arvatud *Fusarium spp*, mille PCR programm tehti 30 tsükliga. Igale PCR reaktsioonile lisati positiivne ja negatiivne kontrolliproov. Positiivse kontrollina kasutati vastava liigi või perekonna puhaskultuuri ning negatiivse kontrollina destilleeritud vett.

Fusarium 'i liigispetsiifiliseks määramiseks kasutati *nested*-PCR programmi ehk pesastatud PCR-i. Antud meetod parandab PCR reaktsiooni tundlikkust ja spetsiifilisust (Evans 2009). Pesastatud PCR-i käigus viidi läbi kaks järjestikust PCR reaktsiooni. Esmalt kasutati praimeripaari Fa+/Ra+ ning seejärel saadud produkti amplifitseeriti omakorda praimeripaar Fa/Ra-ga. PCR analüüs viidi läbi Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Saksamaa) masinaga. Saadud PCR produkti kontrolliti geelelektroforeesil vastavalt peatükis 2.2.2 toodule.

Tabel 1. Uuritavate patogeenide päri- ja vastassuunaliste praimeripaaride järjestused, PCR reaktsioonisegude koostis, kogused ja programm.

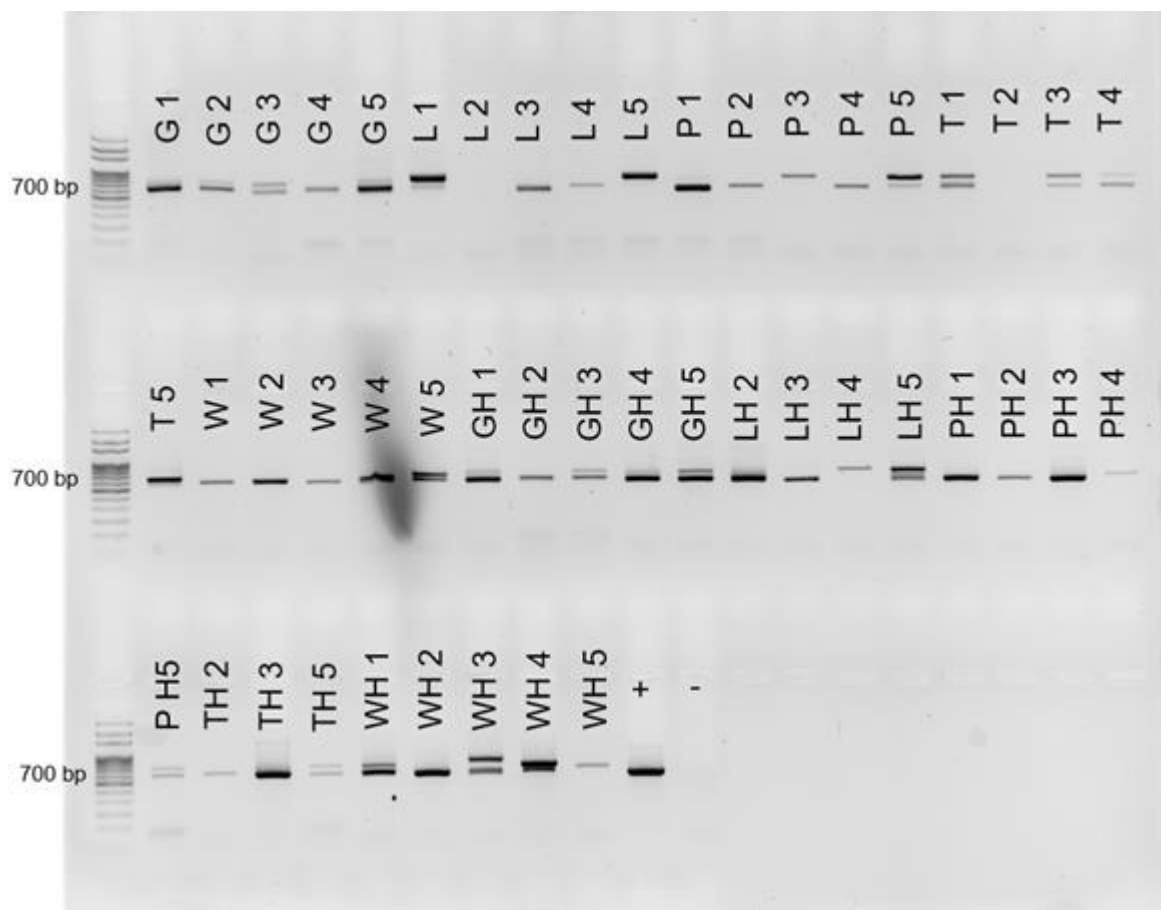
Uuritav patogeen	Päri ja -vastassuunaliste praimeripaaride järjestused	Reaktsioonisegu		PCR programm
<i>Alternaria alternata</i>	(AaltFw) 5'-GCGGGCTGGAACCTCTC-3' (AaltRw) 5'-AGACCTTTGCTGATAGAGAGT-3' (Volz 2014; Leiminger <i>et al.</i> 2016)	MasterMix	5µl	95°C 15 min
		Fw-praimer	1µl	95°C 15 sek
		Rw-praimer	1µl	55°C 30 sek
		H ₂ O	17µl	72°C 30 sek
		DNA	1µl	72°C 10 min
<i>Alternaria solani</i>	(Asol-Fw) 5'-CACCACAAGGACCAACCCA-3' (Asol-Rw) 5'-TGGGGCTGGAAGAGAGCG-3' (Volz 2014; Leiminger <i>et al.</i> 2016)	MasterMix	5µl	95°C 15 min
		Fw-praimer	1µl	94°C 10 sek
		Rw-praimer	1µl	62°C 30 sek
		H ₂ O	16µl	72°C 30 sek
		DNA	2µl	72°C 10 min
<i>Boeremia spp.</i>	(ACT-512F) 5'-ATGTGCAAGGCCGTTTCGC-3' (ACT-783R) 5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3' (Carbone, Kohn 1999)	MasterMix	5µl	95°C 15 min
		Fw-praimer	0,5µl	95°C 15 sek
		Rw-praimer	0,5µl	64°C 30 sek
		H ₂ O	18µl	72°C 1 min
		DNA	1µl	72°C 10 min
<i>Bortyitis cinerea</i>	(FHel81) 5'-ACAGACTTTGGGCACATTCC-3' (RHel82) 5'-CGGTACGTCCAATACGCTTT-3' (Celik <i>et al.</i> 2009)	MasterMix	5µl	95°C 15 min
		Fw-praimer	0,5µl	95°C 15 sek
		Rw-praimer	0,5µl	60°C 30 sek
		H ₂ O	18µl	72°C 1 min
		DNA	1µl	72°C 10 min
<i>Fusarium spp.</i> I reaktsioon	(Fa+) 5'-AACGTCGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCT-3' (Ra+) 5'-ACATACCAATGACGGTGACATAGTAGCG-3' (Karlson <i>et al.</i> 2016)	MasterMix	5µl	95°C 15 min
		Fw-praimer	0,5µl	94°C 1 min
		Rw-praimer	0,5µl	67°C 1 min
		H ₂ O	18µl	72°C 1 min
		DNA	1µl	72°C 10 min
<i>Fusarium spp.</i> II reaktsioon	(Fa) 5'-TCGTCATCGGCCACGTCGACTCT-3' (Ra) 5'-CAATGACGGTGACATAGTAGCG-3' (Karlson <i>et al.</i> 2016)	MasterMix	5µl	95°C 15 min
		Fw-praimer	0,25µl	94°C 1 min
		Rw-praimer	0,25µl	69°C 1 min
		H ₂ O	18µl	72°C 1 min
		DNA	1µl	72°C 10 min

Patogeenide esinemissagedust uuriti liigispetsiifiliste PCR tulemuste alusel (vt lisa 1) ning selle põhjal koostati sagedustabel. Statistilise olulisuse välja selgitamiseks kasutati hii-ruut testi. Andmetöötluseks kasutati programme BlueSky Statistics ja R-Studio.

3. TULEMUSED

3.1 ITS praimeritega PCR analüüsi tulemused

Kokku analüüsiti praimeritega ITS1-F (Gardes, Bruns 1993) ja ITS4 (White *et al.* 1990) 47 kartulimugula proovi. Töö tulemustest puuduvad läbivalt kolm teise proovivõtu proovi (Teele 1 ja 4, Laura 4), mille DNA eraldus ebaõnnestus (vt lisa 1). Analüüsitud proovidest 25 olid esimesest proovivõtust ning tähistatud kartuli sordi nime algustähega ning korduse järjekorranumbriga (joonis 10). Sarnaselt on tähistatud ka ülejäänud 22 proovi, mis teisest proovivõtust ja lisatud juurde lühend H ehk hoidla proov. Positiivne kontroll on tähistatud märgiga „+“ ja negatiivne kontroll märgiga „-“.



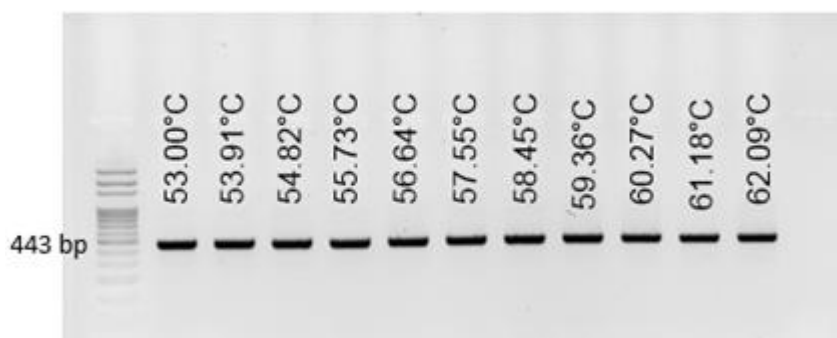
Joonis 10. ITS1-F ja ITS4 praimeritega läbi viidud PCR analüüsi produkt visualiseeritud 1,5% agaroosgeelis, pikkusel 700 aluspaari (bp).

Jooniselt 5 on näha, et geelelektroforeesil tehtud geelipildil tuli välja triip ehk positiivne tulemus peaaegu kõigil analüüsitud proovidel, mis tähendab, et nendes proovides tuvastati seenorganismide olemasolu. Seente olemasolu ei tehtud kindlaks L2 ja T2 proovides.

3.2 Gradient-PCR tulemused *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* ja *Boeremia* spp. praimeritega

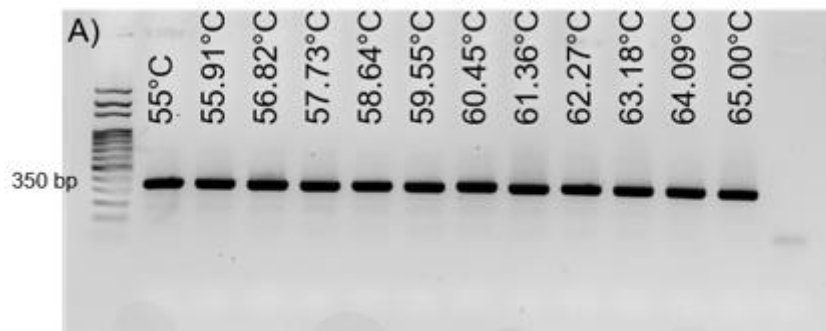
PCR analüüsil on väga olulise tähtsusega *annealing* ehk praimerite seondumistemperatuur DNA ahelaga, mis tähendab DNA komplementaarset kokkusulandumist ehk üksikahelalisest DNA-st (*ssDNA*) tekib kaksikahelaline DNA (*dsDNA*) konkreetsetel temperatuuril. Gradient PCR on tehnika, mis võimaldab empiirilisel määral optimaalse *annealing* temperatuuri, kulutades selleks minimaalselt aega ning tavaliselt ühest gradient PCR analüüsist piisab, et leida sobiv temperatuur (Prezioso, Jahns 2000).

A. alternata puhaskultuuri testiti gradient PCR masinal 11 erineval temperatuuril vahemikus 53,00-62,09°C. Jooniselt 11 on näha, et DNA on korralikult amplifitseeritud kõikidel temperatuuridel ning selline temperatuuride homogeensus kindlustab reprodutseeritavad tulemused edasisel PCR analüüsil. Kõikide gradient-PCR masinal testitud temperatuuride sobivusel valitakse tavaliselt edasiseks liigispetsiifiliseks PCR analüüsiks keskmine või keskmisest kõrgem temperatuur, et tagada praimerite seondumise kõrge spetsiifilisus, sest madalamatel temperatuuridel võib toimuda ka ebaspetsiifiline seondumine. *A. alternata* puhul kasutati erandina liigispetsiifiliseks PCR analüüsiks seondumistemperatuuri temperatuuri 55°C, mis on keskmisest temperatuurist madalam, kuid siiski piisavalt kõrge amplifitseerimaks üles ka vähesel materjalil ning säilitades seejuures spetsiifilisuse.



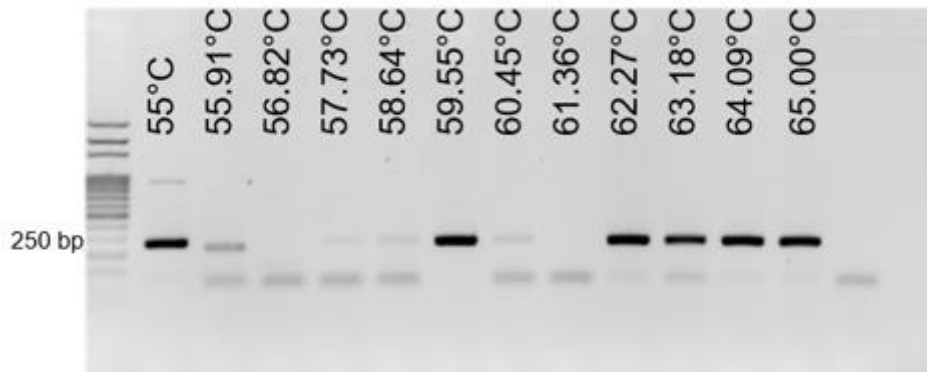
Joonis 11. Gradient-PCR produkt *A. alternata* puhaskultuur visualiseeritud 1,5% agarosgeelis, pikkusel 443 aluspaari (bp).

A. solani ja *Boeremia* spp. puhaskultuuri testiti gradient PCR masinal 12 erineval temperatuuril vahemikus 55-65°C. Jooniselt 12 on *A. solani* puhul näha sarnasust *A. alternata* tulemustega, kus DNA amplifitseerimine on õnnestunud kõikidel temperatuuridel. Liigispetsiifiliseks PCR analüüsiks kasutati *A. solani* puhul seondumistemperatuuri 62°C.



Joonis 12. Gradient-PCR produkt *A. solani* puhaskultuur visualiseeritud 1,5% agarosgeelis, pikkusel 350 aluspaari (bp).

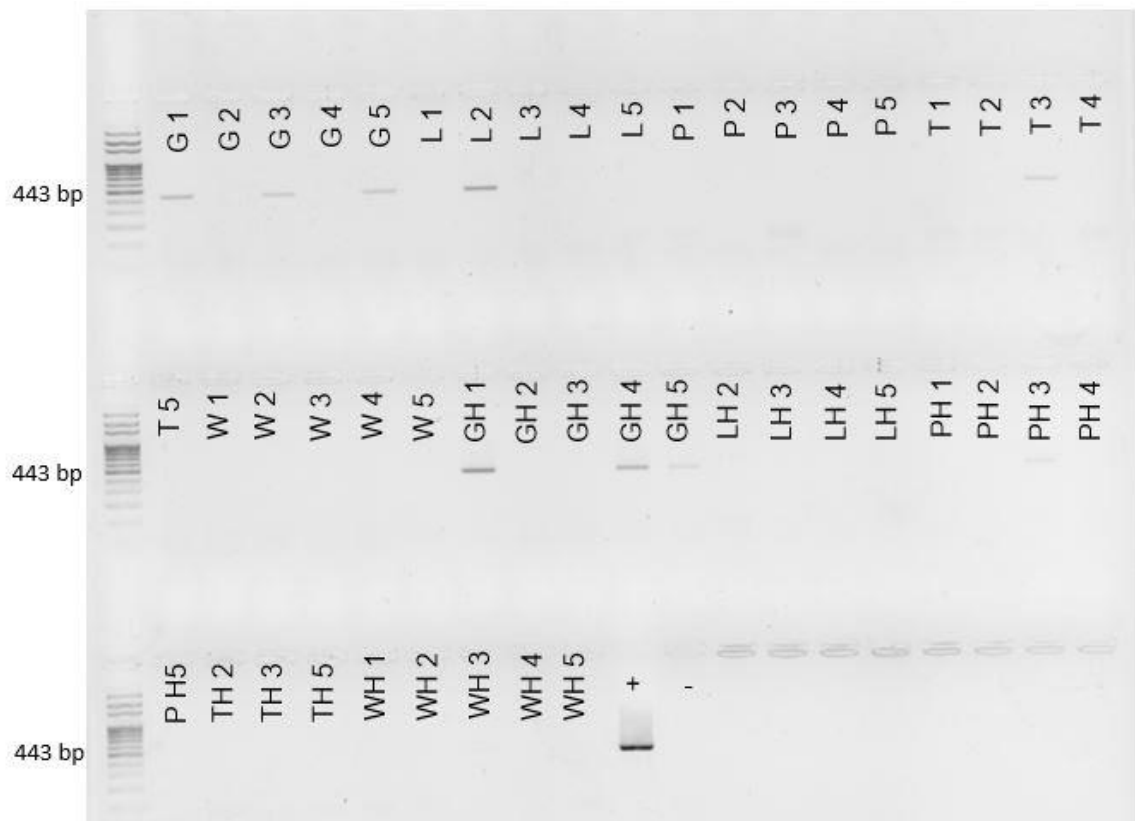
Boeremia spp. gradient PCR analüüsi tulemus on võrreldes *A. alternata* ja *A. solaniga* erinev ning madalamatel temperatuuridel praimerid DNA-d üles ei amplifitseerinud, vaid on vajalik kõrgem temperatuur (joonis 13). Antud analüüsi tulemusest lähtuvalt valiti *Boeremia* spp. liigispetsiifiliseks PCR analüüsiks seondumistemperatuur 64°C.



Joonis 13. Gradient-PCR produkt *Boeremia* spp. puhaskultuur visualiseeritud 1,5% agarosgeelis, pikkusel 250 aluspaari (bp).

3.3 Tulemused *Alternaria alternata* liigispetsiifiliste praimeritega

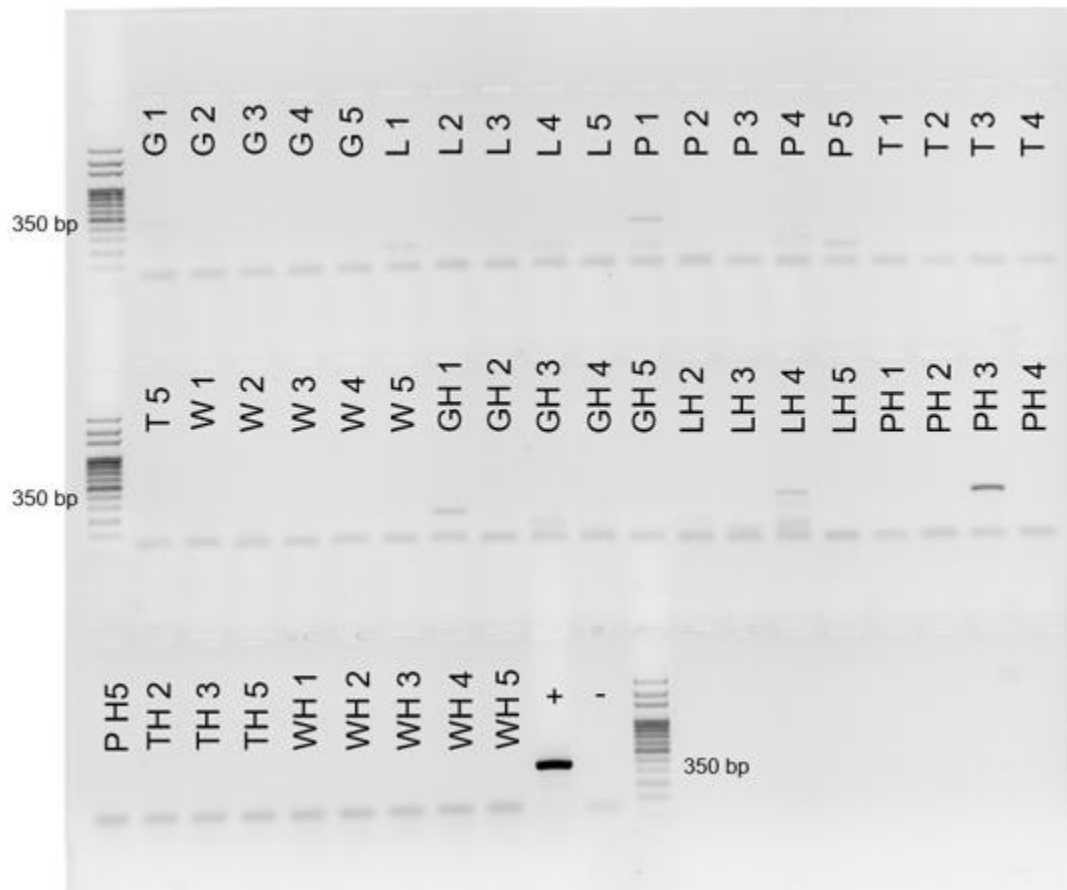
A. alternata liigispetsiifiliste praimeritega AaltFw ja AaltRw (Volz 2014; Leiminger *et al.* 2016) viidi läbi PCR analüüsid 47 prooviga. Praimerid amplifitseerisid *A. alternata* DNA üles kokku üheksas proovis (joonis 14). Viis positiivse tulemuse andnud proovidest olid esimesest proovivõtust (G1, G3, G5, L2, T3) ja neli proovi teisest proovivõtust (GH1, GH4, GH5, PH3).



Joonis 14. *A. alternata* liigispetsiifiliste praimeritega AaltFw ja AaltRw amplifitseeritud DNA lõigud 1,5% agarosgeelil, pikkusel 443 aluspaari (bp). Positiivne kontrollproov (+) *A. alternata* puhaskultuur ning negatiivne kontrollproov (-) destilleeritud vesi.

3.4 Tulemused *Alternaria solani* liigispetsiifiliste praimeritega

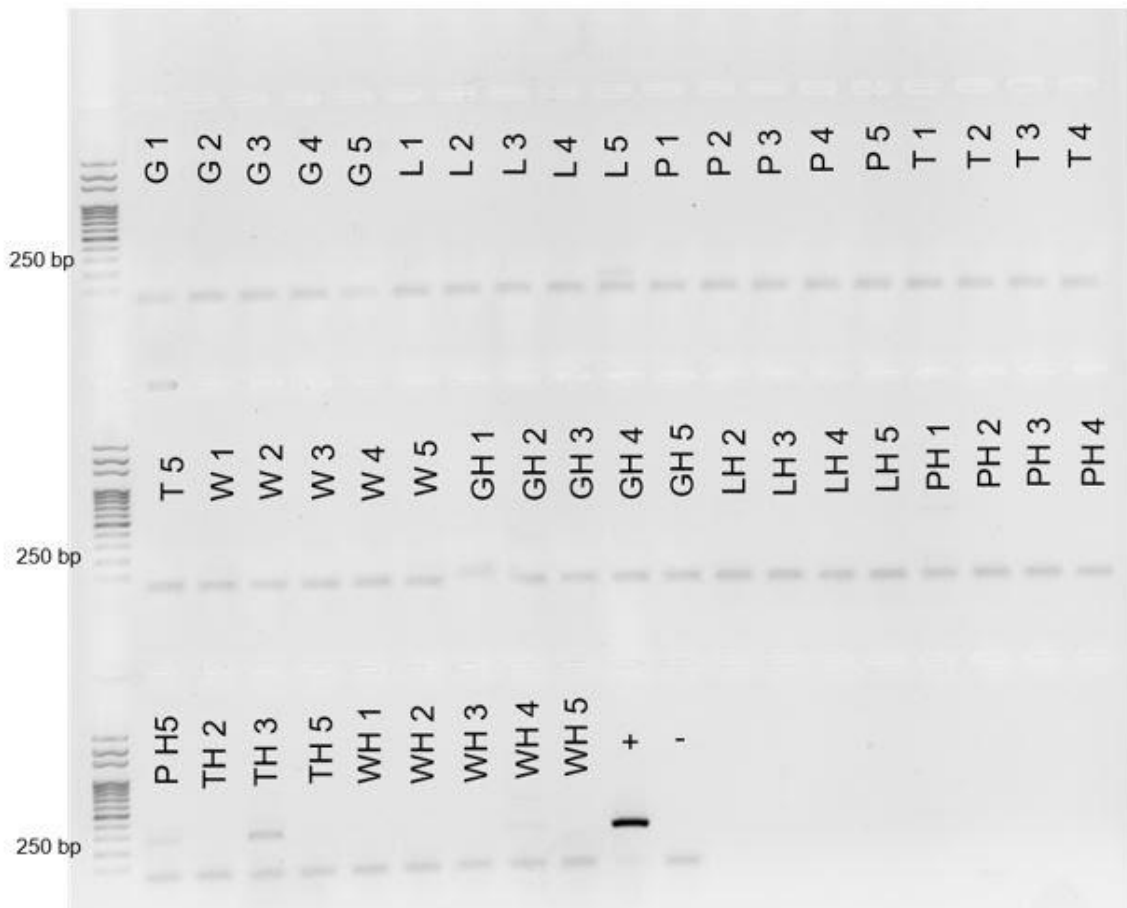
A. solani liigispetsiifiliste praimeritega Asol-Fw ja Asol-Rw (Volz 2014; Leiminger *et al.* 2016) viidi läbi PCR analüüsid 47 prooviga. Positiivse tulemuse ehk *A. solani* DNA leiti kokku kolmes proovis, milleks olid P1, LH4, PH3 (joonis 15). Ülejäänud proovides *A. solani* DNA-d ei tuvastatud.



Joonis 15. *A. solani* liigispetsiifiliste praimeritega Asol-Fw ja Asol-Rw amplifitseeritud DNA lõigud 1,5% agarosgeelil, pikkusel 350 aluspaari (bp). Positiivne kontrollproov (+) *A. solani* puhaskultuur ning negatiivne kontrollproov (-) destilleeritud vesi.

3.5 Tulemused *Boeremia* spp. perekonnaspetsiifiliste praimeritega

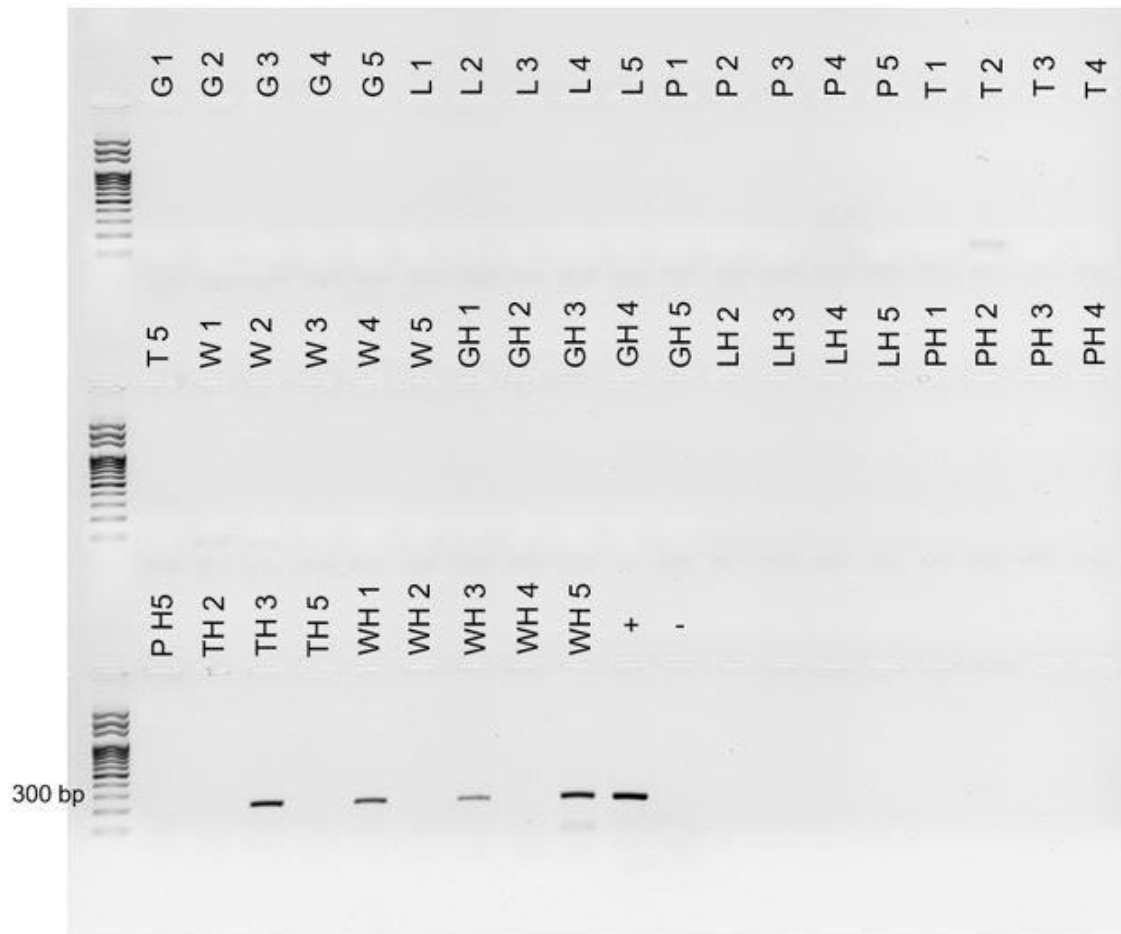
Boeremia spp. liigispetsiifiliste praimeritega ACT-512F ja ACT-783R (Carbone, Kohn 1999) viidi läbi PCR analüüsid 47 prooviga. Valitud praimerite abil tuvastati *Boeremia* spp. DNA kahes proovis (PH5 ja TH3), ülejäänud proovides haigustekitajat ei tuvastatud (joonis 16).



Joonis 16. *Boeremia* spp. perekonnaspetsiifiliste praimeritega ACT-512F ja ACT-783R amplifitseeritud DNA lõigud 1,5% agarosgeelil, pikkusel 250 aluspaari (bp). Positiivne kontrollproov (+) *Boeremia exigua* var. *exigua*. puhaskultuur ning negatiivne kontrollproov (-) destilleeritud vesi.

3.6 Tulemused *Botrytis cinerea* liigispetsiifiliste praimeritega

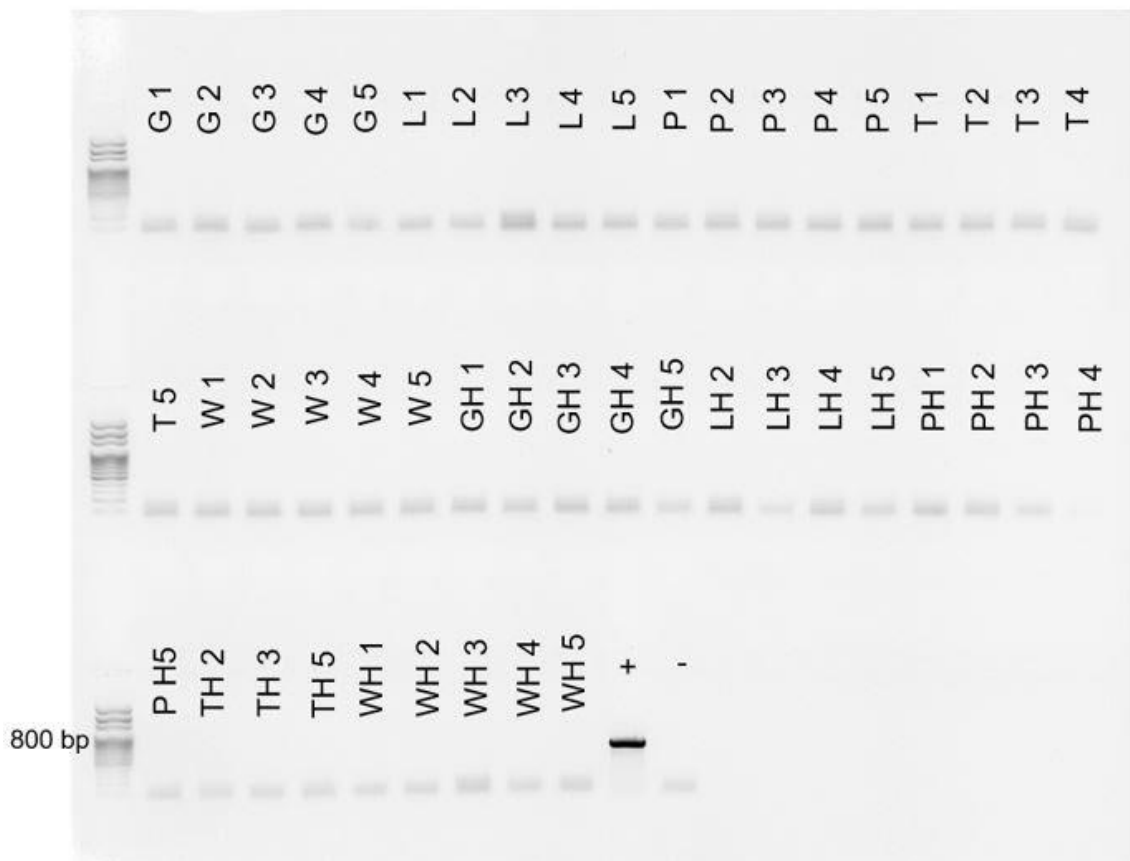
Botrytis cinerea liigispetsiifiliste praimeritega FHel81 ja RHel82 (Celik *et al.* 2009) viidi läbi PCR analüüsid 47 prooviga. Jooniselt 17 on näha, et *Botrytis cinerea* DNA tuvastati kokku viies proovis, millest üks oli esimesest proovivõtust ja neli teisest proovivõtust (T2, TH3, WH1, WH3, WH5).



Joonis 17. *Botrytis cinerea* liigispetsiifiliste praimeritega FHel81 ja RHel82 amplifitseeritud DNA lõigud 1,5% agarosgeelil, pikkusel 300 aluspaari (bp). Positiivne kontrollproov (+) *Botrytis cinerea* puhaskultuur ning negatiivne kontrollproov (-) destilleeritud vesi.

3.7 Tulemused *Fusarium* spp. perekonnaspetsiifiliste praimeritega

Fusarium spp. liigispetsiifilise PCR tegemiseks kasutati kahte paari praimereid Fa+ ja Ra+ ning Fa ja Ra (Karlsson *et al.* 2016). Olenemata pesastatud PCR kasutamisest, ei ole praimerid *Fusarium* spp. DNA-d ühestki proovist üles amplifitseerinud (joonis 18).



Joonis 18. *Fusarium* spp. perekonnaspetsiifiliste praimeripaaridega Fa ja Ra ning Fa+ ja Ra+ amplifitseeritud DNA lõigud 1,5% agarosgeelil, pikkusel 800 aluspaari (bp). Positiivne kontrollproov (+) *Fusarium* spp. puhaskultuur ning negatiivne kontrollproov (-) destilleeritud vesi.

3.8 Haigustekitajate esinemissagedused mugulaproovides

Statistilise analüüsi käigus võrreldi patogeenide esinemissagedusi mugulaproovides kõikidel sortidel kokku, eraldamata esimese ja teise proovivõtu tulemusi. Analüüsid on teostatud kokku 47 prooviga ning liigispetsiifiliste PCR analüüside tulemuste alusel koostatud sagedustabel. Tabelis 2 on toodud välja erinevate haigustekitajatega nakatunud ja puhaste mugulate arv ning on näha, et enim on mugulates tuvastatud *A. alternata* ja *Botrytis cinerea* nakkus. *Fusarium* spp. nakkust ühelgi mugulal ei tuvastatud. Sagedustabeli alusel uuriti patogeenide esinemise statistilist olulisust ning leiti, et haigustekitajate esinemissagedus oli statistiliselt oluliselt erinev ($\chi^2=4$; $p=0,0095$).

Tabel 2. Patogeenide *A. alternata*, *A. solani*, *Boeremia* spp., *Botrytis cinerea* ja *Fusarium* spp. esinemissagedused kartuli mugulaproovides.

Patogeen	Nakatunud	Puhas	Kokku
<i>A. alternata</i>	9	38	47
<i>A. solani</i>	3	44	47
<i>Boeremia</i> spp.	2	45	47
<i>Botrytis cinerea</i>	5	42	47
<i>Fusarium</i> spp.	0	47	47

Lisaks uuriti sordisisesest haigustekitajate esinemist ja sagedust. Tabelis 3 on toodud sortide 'Teele', 'Princess', 'Gala', 'Wega' ja 'Laura' nakatunud ja puhaste mugulaproovide arv, esimesest ja teisest proovivõtust kokku. Sordisiseselt ühelgi sordil statistiliselt olulist erinevust ei olnud ($p>0,05$).

Tabel 3. Viie erineva uuritud kartulisordi nakatunud ja puhaste mugulaproovide esinemissagedused.

Sort	Nakatunud	Puhas	Kokku
'Teele'	3	5	8
'Princess'	3	7	10
'Gala'	6	4	10
'Wega'	3	7	10
'Laura'	2	7	9

Nakatunud mugulaproovides tuvastati PCR analüüsi käigus enamasti ühe mugula kohta üks haigustekitaja, kuid proovis PH3 ('Princess', hoidla) tuvastati nii *A. alternata* kui ka *A. solani* ning proovis TH3 ('Teele', hoidla) *Boeremia* spp. ja *Botrytis cinerea* olemasolu (vt lisa 1).

4. ARUTELU

Tavapärane taimehaiguste määramine põhineb enamasti nakatunud taimede visuaalsel vaatlusel, nähtavate sümptomite ja haigustunnuste uurimisel. Eesti Maaülikoolis on palju uuritud erinevate haiguste levikut ja esinemist nii köögi- ja puuviljades kui ka teraviljaproovides, kuid siiski suurem osa töödest on põhinenud sümptomaatilistel uuringutel ja hinnangutel. Visuaalne vaatlus ei anna aga kunagi lõplikku diagnoosi, sest sarnaseid sümptomeid võivad põhjustada mitmed erinevad haigustekitajad, keskkonnatingimused ja ka üldine füsioloogiline seisund taimes (Hariharan, Prasannath 2021; Riim 2019).

Üheks lahenduseks on kasutada kaasaegseid, suure läbilaskevõimega molekulaarseid patogeenide tuvastamise meetodikaid, nagu näiteks polümeraasi ahelreaktsioon (PCR), reaalaja PCR ja pesastatud PCR (Hariharan, Prasannath 2021). Kõik need meetodid põhinevad klassikalisel PCR analüüsil, mis on olemuselt lihtne ensümaatiline protsess, kuid võimaldab väga vähesest algmaterjalist luua mõne tunniga korduvate tsüklite käigus miljoneid koopiaid (Caribyan, Avashia 2014; Riim 2019). DNA-l põhinevatel PCR meetoditel on potentsiaal saavutada analüüsil suur spetsiifilisus ja tundlikkus, eristamaks ka lähedasi liike. Siiski sõltub PCR analüüsi edukus mitmest faktorist, näiteks kasutatavate praimerite disainist ja analüüsi protokollist ning selle optimeerimisest (Capote *et al.* 2012; Laas 2015; Riim 2019). Antud töös viidi PCR protokoll optimeerimiseks kolme praimeripaariga läbi gradient-PCR analüüs, mille abil saab vähese ajakuluga leida praimeritele sobivaima seondumistemperatuuri, mis on oluline tagamaks praimerite kindel seondumine sihtmärk DNA-ga.

Gradient-PCR abil on võimalik primereid testida kuni kaheteistkümmel erineval temperatuuril ning tavaliselt valitakse keskmine või kõrgem temperatuur, sest mida kõrgem temperatuur, seda spetsiifilisem ja tugevam on praimerite ja genoomse DNA komplementaarne (A-T ja C-G nukleotiidide) seondumine (Ishii, Fukui 2001; Sipos *et al.* 2007). Siiski tuleks gradient-PCR analüüsil saadud sobivaid temperatuure võrrelda ka teiste protokollidega, kus on primereid kasutatud, sest gradient-PCR analüüs teostatakse enamasti

puhaskultuuriga, kuid uuritavates proovides on palju segavaid ja analüüsitulemust mõjutavaid faktoreid (nt DNA kvaliteet ja sisaldus) ning saadud temperatuurid ei pruugi alati täies mahus vastavuses olla. Näiteks mullaproovidest eraldatud DNA eduka amplifikatsiooni peamiseks takistuseks on reaktsiooni käigus orgaaniliste ainete lagundamisel tekkivad humiinhapped ja mitmed humiinaised, mis on tugevad Taq polümeraasi inhibiitorid (Hussain *et al.* 2014; Osawa *et al.* 2021).

Samuti on oluline roll algmaterjalil, sest mugulatest või lehekoest võetud proovides võib DNA eraldusel kaasa tulla või sadeneda mitmesuguseid segavaid aineid, mis hiljem kogu PCR-i, sealhulgas ka praimerite seondumistemperatuuri mõjutavad. Kolme DNA eraldamise meetodi efektiivsust hinnati Yang *et al.* (2021) tehtud töös, kus leiti, et on oluline kasutada taimehaiguste diagnostikas tundlikke ja efektiivseid DNA eraldamise meetodeid, tõstmaks ka PCR analüüsi efektiivsust. Mortimer-Jones (2010) on oma doktoritöös välja toonud, et kartuli mugula koeproovides võivad sadeneda polüsahhariidid ja polüfenoolid, mis pärsivad nukleiinhapete amplifikatsiooni. Protokollides toodud temperatuuride erisused võivad tekkida ka erinevate laborite vahel, mistõttu oli antud töös gradient-PCR kasutamine oluline, tagamaks täpsed tulemused EMÜ fütopatoloogia laboris.

Käesolevas töös otsustati gradient-PCR läbi viia kolme patogeeni praimeritega, nendeks olid *A. alternata*, *A. solani* ja *Boeremia* spp. *Botrytis cinerea* ja *Fusarium* spp. määramiseks kasutatud praimeritega gradient-PCR analüüsi läbi ei viidud, sest neid primereid oldi varasemalt EMÜ fütopatoloogia laboris korduvalt kasutatud ja protokollis optimeeritud ning näiteks perekonna *Fusarium* liike tuvastatud mitte ainult puhaskultuurist vaid ka taimekoest. *A. alternata*-ga tehtud gradient-PCR analüüsil testiti temperatuure vahemikus 53,00-62,09°C ning *A. solani* ja *Boeremia* spp. puhaskultuure vahemikus 55-65°C. Kuna *A. alternata* puhul osutusid sobivaks kõik temperatuurid, siis võttes arvesse analüüsi potentsiaalselt segavad faktorid, katsetingimused ja varasemad kogemused valiti *A. alternata* liigispetsiifiliseks PCR analüüsiks seondumistemperatuur 55°C, mis oli võrreldes Volz (2014) protokolliga küll 5°C võrra madalam, kuid andis antud töö tingimustes häid tulemusi. *A. solani* gradient-PCR tulemus oli sarnane *A. alternata* tulemusega, kus sobivaks osutusid kõik testitud temperatuurid ning PCR analüüsi jaoks valiti temperatuur 62°C, mis oli Volz (2014) protokolliga võrreldes 2°C võrra kõrgem. *Boeremia* spp. puhul näitas gradient-PCR'i tulemus, et antud praimeripaarile kõik temperatuurid seondumiseks ei sobi ning tuleks valida temperatuur alates 62°C või veel kõrgem, seetõttu valiti liigispetsiifiliseks

määramiseks temperatuur 64°C, mis on kõrgem kui Carbone ja Kohn (1999) tehtud uurimuses, kus *Boeremia* spp. praimereid testiti temperatuuridel 50°C, 58°C ja 61°C.

Peale PCR protokollide optimeerimist, viidi läbi viie erineva patogeeni liigispetsiifilised PCR analüüsid, uurimaks patogeenide olemasolu kokku 47-s mugulaproovis. Esimesena uuriti *A. alternata* esinemist mugulaproovides ning patogeeni DNA tuvastati liigispetsiifilisel PCR analüüsil üheksas proovis. Geelil ilmunud triibud olid positiivse kontrollina kasutatud *A. alternata* puhaskultuuriga võrreldes küll üsna nõrgad, kuid selle võisid põhjustada ka analüüsitud DNA madal kvaliteet või vähene sisaldus proovis (McPherson, Møller 2006). Sellegipoolest oli *A. alternata* praimeripaar ikkagi piisavalt tundlik sihtmärkliigi tuvastamiseks ja DNA amplifitseerimiseks. Kuna kõik analüüsitud mugulaproovid olid valitud sümptomaatilistest sarnaste laikudega, siis oli antud juhul PCR analüüsi tegemine oluline just seetõttu, et visuaalselt pole võimalik kahjustunud mugulal *A. alternata* või *A. solani* liikidel vahet teha (Van der Waals *et al.* 2004; Rotem 1994). Seetõttu poleks ka õige teha järeldusi näiteks *A. alternaria* või *A. solani* liikide leviku kohta tuginedes ainult visuaalsetele hinnangutele. Ka näiteks 2012. aastal tehtud katses, kus uuriti kasvatustehnoloogia mõju kartuli-kuivlaiksuse esinemisele, tehti järeldusi vaid vaatluste põhjal (Runno-Paurson *et al.* 2012).

Täpse liigi võimaldab määrata molekulaarne PCR analüüs, mis viidi läbi käesolevas uurimustöös, kus leiti, et *A. solani* oli sümptomaatilistes mugulaproovides vähem esindatud (kokku kolmes proovis) kui *A. alternata*. *Botrytis cinerea*, mis on *A. alternata* ja *A. solani* kahjustusega sarnane ning eristamine põllul on keeruline, tuvastati kokku viiel mugulal, olles seega analüüsitud mugula proovides sagedamini esindatud kui *A. solani*. Sümptomaatilise sarnasuse tõttu peetakse *B. cinerea* kahjustust pigem kartuli-kuivlaiksuseks ning seetõttu pole Eestis täheldatud ka patogeeni laialdasemat levikut kartuli mugulatel ehkki lehestikust tuvastatakse *B. cinerea* põhjustatud hahkhallitust iga-aastaselt (Koppel 2020). Ally *et al.* (2021) uurimuses käsitleti haigussümptomitega tomati lehti ja rohelist vilju ning dokumenteeriti esmakordselt PCR-iga tuvastatud *B. cinerea* Mauritiusel kui tomati-hahkhallituse tekitaja. Kuna *B. cinerea* peremeestaimede hulka kuulub ka kartul, oli eelnev uurimus heaks näiteks, et on vajadus teostada usaldusväärseid uuringuid patogeeni tuvastamiseks ning seejärel rakendada nõuetekohast järelevalvet, ennetus- ja tõrjemeetmeid haigusest mõjutatud piirkondades, sest haigustekitaja võib varjatult oodatust rohkem esineda.

Töös käsitleti veel perekonda *Fusarium*, milles on ülemaailmselt kolmteist erinevat patogeenset liiki, mis kõik põhjustavad kartuli-kuivmädanikku (Heltoft *et al.* 2016; Azil *et al.* 2021) ning mis on ühtlasi levinuim kartuli säilitushaigus. Käesolevas töös läbi viidud perekonna *Fusarium*'i spetsiifiline PCR analüüs aga *Fusarium* liikide laialdast levikut ei kinnitanud, sest analüüsitud mugula proovides ühtegi positiivset proovi ei esinenud. Kuna analüüsimiseks kasutatud praimerid olid eelnevalt kontrollitud ja töökindlad, siis *Fusarium*'i mitte esinemine proovides, tõestab taaskord PCR analüüsi vajalikkust patogeenide määramisel erinevate haigustekitajate sümptomaatiliste sarnasuste tõttu. Loit *et al.* (2019) uuringus kasutati küll alternatiivset meetodit patogeenide määramisel, milleks olid kolmanda põlvkonna sekveneerimistehnoloogiad (PacBio, MinION), kuid antud uuringus tuvastati samuti haigustekitajaid sümptomaatiliselt sarnastel mugulatel ning *Fusariumi* nakkust ei esinenud ka selles uurimuses.

Säilitushaiguste puhul mõjutavad tavapärast sümptomaatilist määramist ka hoidla tingimused ning Tein (2015) on oma doktoritöös toonud välja, et mõnel juhul, kui mugulad on juba *Fusarium*'i tekitatud kuivmädanikuga nakatunud tekib sellega koos ka mugula märgmädaniku infektsioon ning seda eriti niisketes hoiutingimustes või kui mugulad on hoiustamisel märjad. PCR analüüsi abil on võimalik tuvastada haigustekitajad ka latentses staadiumis, mis tähendab, et *Fusariumi* potentsiaalne nakkus oleks võimalik kindlaks teha seemnekartulis, hoides ära haigustekitaja leviku ning levikust tuleneva majandusliku kahju (Heltoft *et al.* 2016). Samuti aitaks *Fusariumi* täpne määramine vähendada kuivmädaniku tõrjeks kasutatavaid keemilise tõrje preparaate, sest mõningate toimeainete suhtes, näiteks tiabendasool, on kuivmädanikutekitajal dokumenteeritud resistentsus (Abbas *et al.* 2013).

Sarnaselt *Fusariumi* tekitatud kartuli-kuivmädanikuga, kahjustavad säilitusperioodil mugulaid *Boeremia* (sün. *Phoma*) perekonna patogeensed liigid, mis tekitavad *Fusariumi* nakkusega sarnaseid kahjustusi, milleks on peamiselt mädanikud. Sageli tekivad mehaaniliselt vigastatud või juba haiguste poolt nõrgestatud mugulatele mitmed nädanikud koos, mistõttu on ühe või teise haigustekitaja määramine keeruline (Koppel 2020). Ka Sicilia *et al.* (2002) tehtud katses uuriti kartuli mugulatel tekkivate erinevate mädanikutekitajate (*Erwinia* spp., *P. infestans*, *P. foveata*, *F. coeruleum*) esinemist ja vastastikmõjusid. Choiseul *et al.* (2007) uurimuses arvutati mädanikku tekitavatele patogeenidele mädanikuindeksid ning leiti, et *P. foveata* (gangreeni põhjustaja) on käsitletud patogeenidest kõrgeima mädanikuindeksiga ning näit on viis korda suurem kui *P. exigual*. Antud töös läbi

viidud liigispetsiifilise PCR analüüsi käigus tuvastati *Boeremia* (sün. *Phoma*) esinemine kokku kahes mugulas. Varasemalt Loit *et al.* (2019) läbi viidud uuringus, kus tuvastati Eestis kogutud proovidest kartulit kahjustavaid patogeene sümptomaatiliselt sarnastest mugulatest nagu ka käesolevas töös, leiti mugula proovidest erinevaid seenpatogeene, sealhulgas ka *Boeremia* spp. liike.

KOKKUVÕTE

Käesoleva magistritöö peamiseks eesmärgideks oli testida erinevaid liigispetsiifilisi PCR praimereid patogeensete kottseente täpseks tuvastamiseks, arendada diagnostikat testides kasutatavaid praimereid gradient-PCR masinal ning tuvastada PCR metoodikat kasutades kogutud kartulimugula proovidest seenpatogeenide *A. alternata*, *A. solani*, *Boeremia* spp., *Botrytis cinerea* ja *Fusarium* spp. olemasolu. Patogeenide liigi kiire ja täpne tuvastamine on oluline vältimaks haigustekitajate laialdast levikut ning rakendamaks efektiivseid tõrjemeetmeid kahjustajate kontrolli all hoidmiseks.

Analüüsitud mugulaproovid koguti 2019. aasta oktoobris Tartumaal asumatelt väiketootjatelt, ilma sordieelistuseta, kuid eeskätt valiti mugulad, mille koore pinnal olid sümptomaatilisel sarnased sissevajanud laigud. Kogutud proovide analüüsimiseks ja patogeenide tuvastamiseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodit, mis on võrreldes tavapäraste, sümptomite hindamise ja morfoloogiliste tunnuste uurimisel põhinevate, määramismeetoditega kiirem, täpsem ja usaldusväärsem. Kuna PCR analüüsi edukus sõltub kasutatavatest praimeritest ja protokollist, viidi käesolevas töös diagnostika arendamiseks läbi kolme praimeripaariga gradient-PCR analüüs, mille abil protokolle optimeeriti. Gradient-PCR analüüsi abil tuvastati sobivaim praimerite seondumistemperatuur, mis tagab liigispetsiifilisel PCR analüüsil praimerite ja genoomse DNA komplementaarse ja spetsiifilise seondumise. Arvestades, et gradient-PCR viiakse läbi puhaskultuuridega, kuid uuritud proovides on mitmeid analüüsi segavaid faktoreid, valiti *A. alternata* seondumistemperatuuriks 55°C, *A. solani* 62°C ja *Boeremia* spp. puhul 64°C.

Optimeeritud protokollidega viidi kokku 47 mugulaprooviga läbi liigispetsiifilised PCR analüüsid patogeenide tuvastamiseks. Proovides tuvastati kartuli-kuivlaiksuse tekitaja *A. alternata* DNA kokku üheksas mugulas ja *A. solani* DNA kolmes mugulas. PCR analüüsi abil oli võimalik antud liike eraldi tuvastada, mida visuaalsel vaatlusel teha ei saa. Hahkhallituse tekitaja *B. cinerea*, mis tihti aetakse segi kartuli-kuivlaiksusega, tuvastati viies mugulas. Sümptomaatilise sarnasuse tõttu esineb *B. cinerea* kahjustust uuritud mugulates varjatult oodatust rohkem. Perekonna *Fusarium* liike käesolevas töös uuritud mugulates ei tuvastatud ehkki tegu on levinuima kartuli säilitushaigusega. *Fusariumi* nakkuse visuaalse

määramise teeb keeruliseks asjaolu, et vigastatud ja nõrgestatud mugulates tekib kehvades hoidla tingimustes mitme haigustekitaja nakkus üheaegselt ning üht mädanikku teisest eristada on keerukas. Läbi viidud PCR analüüsil kasutati eelnevalt kontrollitud ja töökindlaid praimereid, seetõttu on proovides *Fusariumi* nakkuse mitte tuvastamine heaks näiteks, et on vajadus kasutada patogeenide tuvastamiseks usaldusväärsemaid molekulaarseid meetodikaid, sest väga tihti määratakse visuaalsel vaatlusel ekslikult sümptomaatiliselt sarnastel mugulatel *Fusariumi* nakkus. *Fusariumiga* enim sümptomaatiliselt sarnaneva perekonna *Boeremia* (sün. *Phoma*) DNA tuvastati kahes mugulas.

Töös seatud eesmärgid täideti ja hüpoteesid leidsid kinnitust, et valitud praimeritega on võimalik kiiresti ja täpselt tuvastada kartuli mugula proovidest seenpatogeene ning sümptomaatiliselt sarnastest sisse vajunud laikudest mugula pinnal tuvastada erinevad patogeensed kottseened. Töö oluline tulemus on, et väga selge, ühtselt arusaadava ja täpse vastuse patogeenide määramisel ja liigi tuvastamisel saab vaid molekulaarseid meetodikaid kasutada. PCR analüüsi pidev arendus ja kasutus taimehaiguste diagnostikas on oluline samm hoidmaks tulevikus veel paremini saaki hävitavate taimehaiguste levik kontrolli all.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Abbas, M. F., Naz, F., Irshad, G.** (2013). Important fungal diseases of potato and their management – a brief review. – *Mycopath.* Vol 11, Issue 1, pp. 45-50.
- Adhikari, P., Oh, Y., Panthee, D. R.** (2017). Current Status of Early Blight Resistance in Tomato: An Update. – *International Journal of Molecular Sciences.* Vol 18, pp. 2-22.
- Agrios, G.** (2005). *Plant Pathology.* 5th Edition. Academic Press. 952 lk.
- Ally, N. M., Neetoo, H., Ranghoo-Sanmukhiya, M., Hardowar, S., Vally, V., Bunwaree, A., Maudarbaccus, F., Coutinho, T. A., Vojodic, M., Bulajic, A.** (2021). First Report of *Botrytis cinerea* Causing Gray Mold on Greenhouse-Grown Tomato Plants in Mauritius. – *Plant Disease.*
- Azil, N., Stefanczyk, E., Sobkowiak, S., Chihat, S., Bouregghda, H., Sliwka, J.** (2021). Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with tuber dry rot and wilt of potato in Algeria. – *European Journal of Plant Pathology.* Vol 159, pp. 495-509.
- Baltic Agro AS. (s. a). Seemnekartul 'Laura'. [veebileht] <https://koduaed.balticagro.ee/et/seemnekartul/306-seemnekartul-laura.html> (17.03.2021)
- Baltic Agro AS. (s. a). Seemnekartul 'Teele'. [veebileht] <https://koduaed.balticagro.ee/et/seemnekartul/267-seemnekartul-teele.html> (17.03.2021)
- Bennett, A., Ponder, M. M., Garcia-Diaz, J.** (2018). *Phoma* Infections: Classification, Potential Food Sources, and Their Clinical Impact. – *Microorganisms.* Vol 6, No. 58, pp. 1-12.
- Binst Breeding & Selection NV. (2019). Varieties. Gala. [on-line] <https://www.binst.be/en/varieties/gala> (17.03.2021)
- Bojanowski, A., Avis, T.J., Pelletier, S., Tweddell, R. J.** (2013). Management of potato dry rot. – *Postharvest Biology and Technology.* Vol 84, pp. 99–109.
- Buczacki, S., Harris, K.** (2010). Taimekahjurite ja -haiguste käsiraamat. Tallinn: Varrak. 528lk.
- Capote N., Pastrana, A. M., Aguado, A., Sánchez-Torres, P.** (2012). Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance. pp. 151-202. In: *Plant Pathology.* Ed./ C. J. Cumagun. 362 pp. [on-line] <http://www.intechopen.com/books/plant-pathology> (18.05.2021)
- Carbone, I., Kohn, L. M.** (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. – *Mycologia.* Vol 91(3), pp. 553-556.
- Caribyan, L., Avashia, N.** (2014). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). – *Journal of Investigative Dermatology.* Vol. 133, Issue 3, pp. 1-4.

- Celik, M., Kalpulov, T., Zutahy, Y., Ish-shalom, S., Lurie, S., Lichter, A.** (2009). Quantitative and qualitative analysis of *Botrytis* inoculated on table grapes by qPCR and antibodies. – *Postharvest Biology and Technology*. Vol 52, pp. 235-239.
- Centre of Agriculture and Bioscience International.** (2019). *Boeremia exigua* var. *exigua* (leaf spot). Datasheet. [on-line] <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40426>
- Centre of Agriculture and Bioscience International.** (2020). *Boeremia foveata* (potato gangrene). Datasheet. [on-line] <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40420>
- Choiseul, J., Allen, L., Garnegie, S. F.** (2007). Fungi Causing Dry Tuber Rots of Seed Potatoes in Storage in Scotland. – *Potato Research*. Vol 49, pp. 241-253.
- Colman, A., Lima, I. M., Costa, H., Barreto, R. W.** (2020). *Boeremia exigua* causing leaf spots on sweet potato in Brazil. – *Australasian Plant Disease Notes*. Vol 15, article 21.
- D'Ippólito, S., Martín, M.L., Salcedo, M.F., Atencio, H.M., Casalongué, C.A., Godoy, A.V., Fiol, D.F.** (2010). Transcriptome profiling of *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* –infected potato tubers provides evidence of an inducible defense response. – *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Vol 75, pp. 3–12.
- Deb, D., Khan, A., Dey, N.** (2020). Phoma diseases: Epidemiology and control. – *Plant Pathology*. Vol 69, Issue 7, pp. 1203-1217.
- Dita Rodriguez, M.A., Brommonschenkel, K., Matsuoka, K., Mizubuti, E.S.G.** (2006). Components of resistance to early blight in four potato cultivars: Effect of leaf position. – *Journal of Phytopathology*. Vol 154, pp. 230-235.
- Eesti Taimekasvatuse Instituut. (2013). [veebileht] <https://www.etki.ee/> (17.03.2021)
- Eesti Taimekasvatuse Instituut. (2013). Sortide kirjeldused. Princess. [veebileht] <https://www.etki.ee/index.php/91-sortide-kirjeldused/77-kartul?showall=&start=12> (17.03.2021)
- Eesti Taimekasvatuse Instituut. (2013). Sortide kirjeldused. Teele. [veebileht] <https://www.etki.ee/index.php/seemned/sordid#teele> (17.03.2021)
- Eremeev, V., Tein, B., Luik, A.** (2012). Kartul mahe- ja tavaviljeluse süsteemide võrdluskatses aastatel 2008–2012. Teaduselt mahepõllumajandusele. /Toim. L. Metspalu, A. Luik. Tartu. lk 25–27.
- European Cultivated Potato Database. (2005). Varieties. Laura. [on-line] <https://www.europotato.org/varieties/view/Laura> (18.03.2021)
- European Cultivated Potato Database. (2014). Varieties. Wega. [on-line] <https://www.europotato.org/varieties/view/Wega> (18.03.2021)
- Eurolant Pflanzenzucht GmbH. (2021). Varieties. Laura. [on-line] <https://www.eurolant.biz/en/list-of-varieties/laura/> (18.03.2021)
- Evans, M. F.** (2009). The polymerase chain reaction and pathology practice. – *Diagnostic Histopathology*. Vol 15(7), pp. 344-356.

- Fiers, M., Edel-Hermann, V., Chatot, C., Hingrat, Y. L., Alabouvette, C., Steinberg, C.** (2012). Potato soil-borne diseases. A review. – *Agronomy for Sustainable Development*. Vol 32, pp. 93-132.
- Fischer, L., Lipavska, H., Hausman, J-F., Opatrny, Z.** (2008). Morphological and molecular characterization of a spontaneously tuberizing potato mutant: an insight into the regulatory mechanisms of tuber induction. – *BMC Plant Biology*. Vol 8:117.
- Gardes, M., Bruns, T.D.** (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. – *Molecular Ecology*. Vol 2, Issue 2, pp. 113-118.
- Halford, N. G.** (2020). Research on the genetic control of flowering in potato sett to blossom. – *Journal of Experimental Botany*. Vol 71, No. 3, pp. 747-748.
- Hameed, A., Shan-e-Ali Zaidi, S., Shakir, S., Mansoor, S.** (2018). Applications of New Breeding Technologies for Potato Improvement. – *Frontiers in Plant Science*. Vol 9, Article 925.
- Hariharan, G., Prasannath, K.** (2021). Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens: A mini Review. – *Cellular and Infection Microbiology*. Vol 10, pp. 1-14.
- Heltoft, P., Brurberg, M. B., Skogen, M., Le, V. H., Razzaghian, J., Hermansen, A.** (2016). *Fusarium* spp. Causing Dry Rot on Potatoes in Norway and Development of a Real-Time PCR Method for Detection of *Fusarium coeruleum*. – *Potato Research*. Vol 59, pp. 67-80.
- Huber, D., Römheld, V., Weinman, M.** (2012). Relationships between Nutrition, Plant Diseases and Pests. /Eds. Marschner, P. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, 3rd edition. Elsevier Academic Press, Oxford, United Kingdom, pp. 283–298
- Hussain, T., Singh, B. P., Anwar, F.** (2014). A quantitative Real Time PCR based method for the detection of *Phytophthora infestans* causing Late blight of potato, in infested soil. – *Saudi Journal of Biological Sciences*. Vol 21(4), pp. 380-386.
- Ishii, K., Fukui, M.** (2001). Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR. – *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 67(8), pp. 3753-3755.
- Joshi, M., Fogelman, E., Belausov, E., Ginsberg, I.** (2016). Potato root system development and factors that determine its architecture. – *Journal of Plant Physiology*. Vol 205, pp. 113-123.
- Jõudu, J.** (2002). Kartulikasvatus. /Koost. J. Jõudu. Tartu. Eesti Vabariigi Põllumajandusministeerium. Eesti Põllumajandusülikool. 13-18 lk.
- Karlsson, I., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Durling, M. B., Kolseth, A-K., Steinberg, C., Persson, K., Friberg, H.** (2016). Genus-Specific Primers for Study of *Fusarium* Communities in Field Samples. – *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 82, No 2, pp. 491-501.
- Koppel, M.** (2020). Kartuli kahjustajad ja nende tõrje. Eesti Taimekasvatuse Instituut. 48 lk.
- Laas, M.** (2015). Mäni-pudetõve tekitaja (*Lophodermium segetum*) varajane diagnostika. Bakalaureusetöö. Tartu. 45 lk.

- Leiminger, J. H., Auinger, H.-J., Wenig, M., Bahnweg, G., Hausladen, H.** (2016). Genetic variability among *Alternaria solani* isolates from potatoes in Southern Germany based on RAPD-profiles. – *Journal of Plant Diseases and Protection*. Vol 120, pp. 164-172.
- Leit, I.** (2014). Hahkhallitus (*Botrytis cinerea*) katmikala viinapuudel (*Vitis* ssp.), selle ennetamise ja tõrjumise võimalused. Bakalaureusetöö. Tartu. 38lk.
- Loit, K., Adamson, K., Bahram, M., Puusepp, R., Anslan, S., Kiiker, R., Drenkhan, R., Tedersoo, L.** (2019). Relative Performance of MinION (Oxford Nanopore Technologies) versus Sequel (Pacific Biosciences) Third Generation Sequencing Instruments in Identification of Agricultural and Forest Fungal Pathogens. – *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 85, Issue 21.
- Loit, K., Adamson, K., Bahram, M., Puusepp, R., Anslan, S., Kiiker, R., Drenkhan, R., Tedersoo, L.** (2019). Relative Performance of MinION (Oxford Nanopore Technologies) versus Sequel (Pacific Biosciences) Third-Generation Sequencing Instruments in Identification of Agricultural and Forest Fungal Pathogens. – *Applied Environmental Microbiology*. Vol 85, Issue 21.
- Lõiveke, H.** (1995). Taimekaitse käsiraamat. Tallinn: Põllumajandusministeerium. 389 lk.
- Lõiveke, H.** (2002). Kartulikasvatus. /Koost. J. Jõudu. Tartu. Eesti Vabariigi Põllumajandusministeerium. Eesti Põllumajandusülikool. 347-390 lk
- Machida-Hirano, R.** (2015). Diversity of potato genetic resources. – *Breeding Science*. Vol 65, pp. 26-40.
- Mamgain, A., Roychowdhury, Tah, J.** (2013). *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. – *Journal of Biology*. Vol 1, pp. 01-09.
- Martinelli, F., Scalenghe, R., Davino, S., Panno, S., Scuderi, G., Ruisi, P., Villa, P., Stroppiana, D., Boschetti, M., Goulart, L. R., Davis, C. E., Dandekar, A. M.** (2015). Advanced methods of plant disease detection. – *Agronomy for Sustainable Development*. Vol. 35, Issue 1, pp. 1-25.
- McCartney, H. A., Foster, J. S., Fraaije, A. B., Ward, E.** (2003). Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. – *Pest Management Science*. Vol. 59, No. 2, pp. 129-142.
- McPherson, M. J., Møller, S. G.** (2006). PCR: The Basics. (2. ed.). New York: Taylor & Francis. 292 pp.
- Michailides, T. J., Morgan, D. P., Ma, Z., Luo, Y., Felts, D., Doster, M. A., Reyes, H.** (2005). Conventional and molecular assays aid diagnosis of crop diseases and fungicide resistance. – *California Agriculture*. Vol. 59, No. 2, pp. 115-123.
- Mortimer-Jones, S. M.** (2010). Development of Diagnostics Tools for the Seed Potato Industry. Doctoral thesis. Australia. 123 pp.
- Norika Kartoffelzucht GmbH. (2021). Sortenkatalog. Gala. [on-line] <https://norika.biz/Sortenkatalog> (17.03.2021)

- Osawa, H., Suzuki, N., Akino, S., Araki, H., Asano, K., Akai, K., Kondo, N.** (2021). Quantification of *Phytophthora infestans* population densities and their changes in potato field soil using real-time PCR. – *Scientific Reports*. Vol 11, article 6266.
- PM0281: Põllumajandusmaa ja -kultuurid maakonna järgi. (andmed uuendatud 22.02.2021). – *Eesti Statistika andmebaas*. <https://andmed.stat.ee/et/stat> (17.03.2021)
- Prezioso, V. R., Jahns, A.** (2000). Using Gradient PCR to Determine the Optimum Annealing Temperature. [on-line] <https://www.drugdiscoveryonline.com/doc/using-gradient-pcr-to-determine-the-optimum-a-0002> (09.04.2021)
- Riim, P.** (2019). Uuenduslikud meetodid taimepatogeenide tuvastamisel ja nende rakendamine põllumajanduses. Bakalaureusetöö. Tartu. 39 lk.
- Robertson, T. M., Alzaabi, A. Z., Robertson, M. D., Fielding, B. A.** (2018). Starchy Carbohydrates in a Healthy Diet: The Role of the Humble Potato. – *Nutrients*. Vol 10, pp. 1-28.
- Rooma, L.** (2016). Taimehaigused ja -kahjurid, umbrohud. Järvamaa Kutsehariduskeskus Paide: Kuma Print. 195 lk.
- Rotem, J.** (1994). The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press
- Runno-Paurson, E., Loit, K., Hansen, M., Tein, B., Williams, I. H., Mänd, M.** (2015). Early blight destroys potato foliage in the northern Baltic region. – *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science*. Vol 65, Issue 5, pp. 422-432.
- Runno-Paurson, E., Tein, B., Luik, A., Mänd, M.** (2012). Kasvatustehnoloogia mõjutab kartuli kuivlaiksuse esinemist. Teaduselt mahepõllumajandusele. Eesti Loodusfoto. Lk 79-81.
- Schena, L., Li Destri Nicosia, M. G., Sanzani, S. M., Faedda, R., Ippolito, A., Cacciola, S. O.** (2013). Development of quantitative PCR detection methods for phytopathogenic fungi and oomycetes. – *Journal of Plant Pathology*. Vol. 95, pp. 7-24.
- Sicilia, C., Copeland, R. B., Cooke, L. R.** (2002). Comparison of the interactions of *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* with *Phytophthora infestans*, *Phoma foveata* and *Fusarium coeruleum* in rotting potato tubers. – *Potato Research*. Vol 45, pp. 237-245.
- Sipos, R., Szekely, A. J., Palatinszky, M., Revesz, S., Marialigeti, K., Nikolausz, M.** (2007). Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. – *FEMS Microbiol Ecol*. Vol 60(2), pp 341-350.
- Solana GmbH & Co. KG. (s. a). Potato varieties. Princess. [on-line] https://www.solana.de/kartoffelsorten-detail_en/items/princess.html (17.03.2021)
- Sousa, A. M., Pereira, M. O.** (2013). A prospect of current microbial diagnosis methods. – *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. /Ed. Mendes-Vilas, A. Vol. 3. Spain: Formatex Research Center, pp. 1429-1438.
- Stevenson, W.R., Loria, R., Franc, G.D., Weingartner, D.P.** (2001). Compendium of Potato Diseases, 2nd edition. The American Phytopathological Society, St. Paul, USA, 144 pp.

- Strygina, K. V., Kochetov, A. V., Khlestkina, E. K.** (2019). Genetic control of anthocyanin pigmentation of potato tissues. – *BMC Genetics*. Vol 20, pp. 35-53.
- Tähtjärv, T.** (2016). Doktoritöö. Kartuli sordiresistentsuse ja kartulilehemädanikutekitaja populatsiooni uuringud Eesti sordiareteses. Eesti Maaülikool. Tartu. 160 lk.
- Tamela, L.** (2014). Bakalaureusetöö. Kuivlaiksus erinevatel kartulisortidel. Eesti Maaülikooli põllumajandus- ja keskkonnainstituut. Tartu. 39 lk.
- Tartlan, L.** (2013). Maalehe kartuliraamat. /Toim. V. Ereemeev. Viljandi: Printon. 128lk.
- Tein, B.** (2015). Viljelussüsteemide mõju kartuli mugulasaagile ja kvaliteedile. Doktoritöö. Tartu. 180 lk.
- Tsahkna, A.** (2002). Kartulikasvatus. /Koost. J. Jõudu. Tartu. Eesti Vabariigi Põllumajandusministeerium. Eesti Põllumajandusülikool. 103-136 lk.
- Tsahkna, A.** (2010). Mahepõllumajanduslik kartulikasvatus. /Toim. A. Vetemaa, M. Mikk. Tallinn: Põllumajandusministeerium. 18 lk
- Turkensteen, L. J.** (2005). Early Blight. Potato Diseases. PlantijnCaspaire. lk. 19-20.
- Van der Waals, J. E., Korsten, L., Aveling, T. A. S.** (2001). A review of early blight of potato. – *African Plant Protection*. Vol 7, No. 2.
- Van der Waals, J.E., Korsten, L., Skippers, B.** (2004). Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. – *Plant Disease*. Vol 88, pp. 959-964.
- Volz, A.** (2014). Qualitative PCR diagnostics of *A. solani* and *A. alternata*. – *Protocol*. Wissenschaftszentrum Weihenstephan.
- Walder, F., Schlaeppli, K., Wittwer, R., Held, A. Y., Vogelgsang, S., van der Heijden, M. G. A.** (2017). Community Profiling of Fusarium in Combination with Other Plant-Associated Fungi in Different Crop Species Using SMRT Sequencing. – *Frontiers in Plant Science*. Vol 8.
- Ward, E., Foster, S. J., Fraaije, B. A., McCartney, H. A.** (2004). Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. – *Annals of Applied Biology*. Vol. 145, Issue 1, pp. 1-16.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., Taylor, J. W.** (1990). PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. Chapter 38 – Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. /Eds. MA. Innis, DH. Gelfand. Academic Press: London, pp. 315-322.
- Woudenberg, J. H. C., Seidl, M. F., Groenewald, J. Z., de Vries, M., Stielow, J. B., Thomma, B. P. H. J., Crous, P. W.** (2015). *Alternaria* section *Alternaria*: Species, *formae speciales* or pathotypes? – *Studies in Mycology*. Vol 82, pp. 1-21.
- Xhemali, B., Bresilla, B., Cacaj, I.** (2015). Comparision of methods used for detection and identification of soil-borne plant pathogens affecting vegetable crops. – *Sixth International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2015"*. Jahorina, Bosnia and Herzegovina. Book of Proceedings, pp. 1070-1074.

- Yang, Y., Zhou, Q., Zahr, K., Harding, M. W., Feindel, D., Feng, J.** (2021). Impact of DNA extraction efficiency on the sensitivity of PCR-based plant disease diagnosis and pathogen quantification. - *European Journal of Plant Pathology*. Vol 159, pp. 583-591.
- Zaheer, K., Akhtar, M. H.** (2014). Recent advances in potato production, usage, nutrition – a Review. – *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 56, Issue 5, pp. 711-721.

LISAD

Lisa 1: Liigispetsiifiliste PCR analüüside tulemuste tabel.

PROOV	ITS		<i>Alternaria alternata</i>		<i>Alternaria solani</i>		<i>Boeremia spp.</i>		<i>Fusarium spp.</i>		<i>Bortyis cinerea</i>	
	I proovivõtt	II proovivõtt	I proovivõtt	II proovivõtt	I proovivõtt	II proovivõtt	I proovivõtt	II proovivõtt	I proovivõtt	II proovivõtt	I proovivõtt	II proovivõtt
Gala 1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Gala 2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gala 3	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gala 4	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Gala 5	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Laura 1	1	Puudu	0	Puudu	0	Puudu	0	Puudu	0	Puudu	0	Puudu
Laura 2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Laura 3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Laura 4	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Laura 5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Princess 1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Princess 2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Princess 3	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Princess 4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Princess 5	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Teele 1	1	Puudu	0	Puudu	0	Puudu	0	Puudu	0	Puudu	0	Puudu
Teele 2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Teele 3	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Teele 4	1	Puudu	0	Puudu	0	Puudu	0	Puudu	0	Puudu	0	Puudu
Teele 5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wega 1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Wega 2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wega 3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Wega 4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wega 5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Lisa 2: Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendajate kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Pille Riim,

sünniaeg 10/04/1997

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö Kartulil (*Solanum tuberosum* L.) esinevate seenpatogeenide määramine polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodil,

mille juhendajad on Liina Soonvald ja Riinu Kiiker,

1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,

1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja

1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor

Pille Riim

(allkiri)

Tartu, 25.05.2021

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele

Liina Soonvald
(juhendaja nimi ja allkiri)

25.05.2021
(kuupäev)

Riinu Kiiker
(juhendaja nimi ja allkiri)

25.05.2021
(kuupäev)